

Aus der Franz-Volhard-Klinik
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Linksventrikuläre Expression verschiedener Housekeeping-Gene
bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Jeannine Rettschlag
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. PD Dr. med. Roland Willenbrock
2. Prof. Dr. P. Persson
3. Prof. Dr. med. R. H. G. Schwinger

Datum der Promotion: 12.12.2003

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es einen geeigneten internen Standard für die linksventrikuläre mRNA-Quantifizierung bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz in der Ratte zu finden. Die mRNA-Expression von GAPDH, 18SrRNA, Cyclophilin und Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) wurde vier Wochen nach Induktion von Hypertrophie (kleiner aortokavalärer Shunt) und Herzinsuffizienz (großer aortokavalärer Shunt bzw. Myokardinfarkt) mit Hilfe des Ribonuklease Protektion Assay (RPA) und der TaqMan[®] PCR bestimmt. Die linksventrikuläre ANP-mRNA-Expression war in allen untersuchten Modellen unabhängig von der angewendeten Detektionsmethode erhöht.

Die mRNA-Expression der Housekeeping Gene mit Hilfe des RPA bestimmt, war in allen untersuchten Modellen im Vergleich zu den Kontrollen unverändert (GAPDH: kleiner Shunt: 105.1 ± 7.4 , großer Shunt: 105.2 ± 6.8 , MI: 88.4 ± 3.7 ; 18SrRNA: kleiner Shunt: 110.7 ± 8.2 , großer Shunt: 104.4 ± 8.9 , MI: 107.5 ± 12.0 ; Cyclophilin: kleiner Shunt: 96.4 ± 7.9 , großer Shunt: 112.9 ± 4.9 , MI: 95.7 ± 13.8 ; PBGD: kleiner Shunt: 81.9 ± 6.3 , großer Shunt: 83.7 ± 4.7 , MI: 79.8 ± 9.7 ; % Kontrolle). In der sehr sensitiven TaqMan[®] PCR zeigte sich eine veränderte mRNA-Expression von GAPDH, PBGD und Cyclophilin, lediglich 18S wurde unverändert exprimiert (GAPDH: kleiner Shunt: 114.5 ± 18.7 , großer Shunt: 133.6 ± 19.1 , MI: 64.2 ± 6.2 , $p < 0.01$; 18SrRNA: kleiner Shunt: 100.5 ± 18.1 , großer Shunt: 109.7 ± 15.8 , MI: 122.7 ± 13.0 ; Cyclophilin: kleiner Shunt: 110.7 ± 8.0 , großer Shunt: 166.8 ± 19.2 , $p < 0.01$, MI: 80.0 ± 9.4 ; PBGD: kleiner Shunt: 109.2 ± 14.4 , großer Shunt: 116.8 ± 7.1 , MI: 62.8 ± 6.3 , $p < 0.01$; % Kontrolle).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass 18SrRNA aufgrund der unabhängig von der verwendeten Quantifizierungsmethode stabilen Expression, für die kardiale RNA-Quantifizierung in den untersuchten Tiermodellen am besten geeignet ist.

Eigene Schlagworte:

Housekeeping-Gene, GAPDH, 18SrRNA, Cyclophilin, Porphobilinogen Desaminase, Herzinsuffizienz

Abstract

The purpose of this study was to identify an appropriate left ventricular mRNA as internal standard in gene expression analysis in cardiac hypertrophy and heart failure in the rat. Expression levels of GAPDH, 18SrRNA, Cyclophilin and porphobilinogen desaminase (PBGD) were measured four weeks after induction of either cardiac hypertrophy (small aortocaval shunt) or heart failure (large aortocaval shunt or myocardial infarction) using Ribonuclease protection assay (RPA) and TaqMan[®] PCR.

The left ventricular expression of ANP mRNA was increased in all these experimental models independently of the used method. Using RPA the mRNA expression of all studied housekeeping genes was unchanged in all experimental models compared to controls (GAPDH: small shunt: 105.1 ± 7.4 , large shunt: 105.2 ± 6.8 , MI: 88.4 ± 3.7 ; 18SrRNA: small shunt: 110.7 ± 8.2 , large shunt: 104.4 ± 8.9 , MI: 107.5 ± 12.0 ; Cyclophilin: small shunt: 96.4 ± 7.9 , large shunt: 112.9 ± 4.9 , MI: 95.7 ± 13.8 ; PBGD: small shunt: 81.9 ± 6.3 , large shunt: 83.7 ± 4.7 , MI: 79.8 ± 9.7 ; % control). Using the TaqMan[®] PCR as a much more sensitive method only 18SrRNA levels were unchanged whereas GAPDH, PBGD and Cyclophilin mRNA expression was regulated (GAPDH: small shunt: 114.5 ± 18.7 , large shunt: 133.6 ± 19.1 , MI: 64.2 ± 6.2 , $p < 0.01$; 18SrRNA: small shunt: 100.5 ± 18.1 , n.s., large shunt: 109.7 ± 15.8 , n.s., MI: 122.7 ± 13.0 ; Cyclophilin: small shunt: 110.7 ± 8.0 , large shunt: 166.8 ± 19.2 , $p < 0.01$, MI: 80.0 ± 9.4 ; PBGD: small shunt: 109.2 ± 14.4 , large shunt: 116.8 ± 7.1 , MI: 62.8 ± 6.3 , $p < 0.01$; % control).

This study showed that independently of the used method 18SrRNA is stable expressed and best suitable as internal standard for the quantitative analysis of cardiac mRNA.

Keywords:

housekeeping genes, GAPDH, 18SrRNA, Cyclophilin, porphobilinogen desaminase, heart failure

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	8
1.1 DNA UND RNA ALS TRÄGER DER GENETISCHEN INFORMATION	8
1.1.1 Einteilung und Aufbau eukaryonter Gene	9
1.1.2 Transkription	11
1.1.3 Translation	12
1.1.4 Regulation der Genexpression	13
1.2 HOUSEKEEPING-GENE	15
1.2.1 Anwendung als interner Standard	17
1.2.2 Probleme bei der Anwendung	17
1.2.3 Typische Housekeeping-Gene	18
1.2.3.1 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	18
1.2.3.2 Cyclophilin	19
1.2.3.3 Porphobilinogen-Desaminase (PBGD)	20
1.2.3.4 18S-ribosomale-RNA (18SrRNA)	21
1.3 HERZHYPERTROPHIE UND HERZINSUFFIZIENZ	22
1.3.1 Ätiologie	22
1.3.2 Kompensationsmechanismen	22
1.3.3 Regulation der Genexpression	24
1.3.4 Atriales natriuretisches Peptid (ANP)	26
2. ZIEL DER ARBEIT	28
3. MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 TIEREXPERIMENTE	29
3.1.1 Tierhaltung und Tierzahlen	29
3.1.2 Induktion der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz	29
3.1.2.1 Shunt-Operation	29
3.1.2.2 Myokardinfarkt-Induktion	31
3.1.3 Hämodynamische Messungen	31
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	32
3.2.1 Extraktion und Quantifizierung der RNA	34
3.2.1.1 RNA-Extraktion	35
3.2.1.2 RNA-Quantifizierung	36
3.2.1.3 Denaturierende Gelelektrophorese der RNA	36
3.2.2 Sondenherstellung	38
3.2.2.1 Primer-Design	38
3.2.2.2 RT-PCR	39
3.2.2.3 Klonierung	40

3.2.2.4. Plasmidpräparation (Minipräparation).....	42
3.2.2.5 Sequenzierung	43
3.2.2.6 Plasmidpräparation (Maxipräparation)	43
3.2.2.7 In vitro-Transkription	45
3.2.3 Ribonuklease-Protektion-Assay und Quantifizierung der mRNA-Expression	45
3.2.3.1 Durchführung des RPA.....	45
3.2.3.2 PhosphorImager.....	46
3.2.3.3 Analyse und Quantifizierung des RPA	47
3.2.4 TaqMan™ -PCR und Quantifizierung der mRNA-Expression	47
3.2.4.1 Durchführung der TaqMan™ -PCR	47
3.2.4.2 Auswertung TaqMan™ -PCR	48
3.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER mRNA-EXPRESSION.....	50
4. ERGEBNISSE	51
4.1 HERZGEWICHTE UND HÄMODYNAMISCHE MESSUNGEN	51
4.1.1 Herzgewichte der Shunt-operierten Tiere.....	51
4.1.2 Hämodynamische Parameter der Shunt-operierten Tiere	52
4.1.3 Herzgewichte der Infarkttiere.....	53
4.1.4 Hämodynamische Parameter der Infarkttiere	53
4.1.5 Infarktgröße.....	54
4.2 LINKSVENTRIKULÄRE mRNA-EXPRESSION DES HYPERTROPHIEMARKERS ANP IN DEN VERSCHIEDENEN TIERMODELLEN.....	55
4.2.1 ANP-mRNA-Expression im kleinen und großen Shunt	55
4.2.2 ANP-mRNA-Expression beim Infarkt	55
4.3 LINKSVENTRIKULÄRE mRNA-EXPRESSION DER HOUSEKEEPING-GENE IN DEN VERSCHIEDENEN TIERMODELLEN.....	56
4.3.1 GAPDH-mRNA-Expression im kleinen und großen Shunt	56
4.3.2 GAPDH-mRNA-Expression beim Infarkt	57
4.3.3 Cyclophilin-mRNA-Expression im kleinen und großen Shunt	58
4.3.4 Cyclophilin-mRNA-Expression beim Infarkt	58
4.3.5 PBGD-mRNA-Expression im kleinen und großen Shunt	59
4.3.6 PBGD-mRNA-Expression beim Infarkt	60
4.3.7 18SrRNA-Expression im kleinen und großen Shunt	60
4.3.8 18SrRNA-Expression beim Infarkt	61
5. DISKUSSION	62
5.1 DER AORTOKAVALE SHUNT UND DER MYOKARDINFARKT ALS HYPERTROPHIE- BZW. HERZ- INSUFFIZIENZMODELL	62
5.2 DIE LINKSVENTRIKULÄRE ANP-MRNA-EXPRESSION	64
5.3 DIE LINKSVENTRIKULÄRE mRNA-EXPRESSION DER HOUSEKEEPING-GENE	65
5.3.1 GAPDH	65
5.3.2 Cyclophilin	67

5.3.3 <i>PBGD</i>	69
5.3.4 <i>18SrRNA</i>	70
5.4 KRITISCHE BETRACHTUNG DER VERWENDETEN METHODEN UND SCHLUSSFOLGERUNGEN	72
6. ZUSAMMENFASSUNG	75
7. LITERATURVERZEICHNIS	77
8. DANKSAGUNG	87
9. LEBENSLAUF	88
10. ERKLÄRUNG	89

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure
AMP	Adenosinmonophosphat
BNP	brain natriuretic peptide
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dP/dt_{\max}	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
HF	Herzfrequenz
HG	Herzgewicht
HZV	Herzzeitvolumen
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
KG	Körpergewicht
LA	linker Vorhof
LV	linker Ventrikel
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAP	mittlerer arterieller Druck
Mg	Magnesium
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PCR	Polymerasekettenreaktion
RA	rechter Vorhof
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RHG	relatives Herzgewicht
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Ribonuklease-Protektion-Assay
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
RV	rechter Ventrikel
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
snRNA	small nuklear Ribonukleinsäure
T	Thymin
TAF	TATA-Bindeprotein assoziierte Faktoren
TBP	TATA-Bindeprotein
TF	Transkriptionsfaktor
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
UBF	upstream binding Factor
UCE	upstream control Element
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
ZVD	zentralvenöser Druck

1. Einleitung

Die molekularbiologische Grundlagenforschung beschäftigt sich unter anderem mit der Untersuchung von Genen und deren Regulation. Dabei ist die Anpassung der Genexpression an verschiedene Umweltbedingungen oder Erkrankungen und ihre daraus resultierende Veränderung eines der wesentlichen Forschungsschwerpunkte.

Bereits 1961 veröffentlichten Jacob und Monod ein erstes Modell zur Genregulation, das sogenannte „Operonmodell“¹. Mittlerweile ist durch intensive Forschung das Verständnis von der Speicherung, Übertragung und Expression genetischer Informationen viel größer geworden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind jedoch noch viele Fragen ungeklärt.

1.1 DNA und RNA als Träger der genetischen Information

1944 identifizierten Avery et al. die DNA als Träger der genetischen Information². Diese befindet sich bei Eukaryonten mit Ausnahme der mitochondrialen DNA im Zellkern. Sie setzt sich aus den Purinbasen Adenin (A), Guanin (G) und den Pyrimidinbasen Cytosin (C), Thymin (T) zusammen, deren Reihenfolge die DNA-Sequenz bestimmt. Jede Zelle enthält die gesamte genetische Information. Das Genom höherer Organismen kodiert ca. 100.000 bis 140.000 verschiedene Genprodukte^{3;4}. Die entwicklungsabhängige Regulation der Genexpression ermöglicht die Differenzierung der Zelle und ihre Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen^{5;6}.

Die DNA wird durch Transkription in RNA umgeschrieben, die durch Translation in die entsprechende Aminosäuresequenz des Proteins umgewandelt wird. Genetische Informationen werden in der Regel nur von der DNA über die RNA zum Protein übertragen. Eine Ausnahme bilden Retroviren, die mit Hilfe der reversen Transkriptase RNA in DNA umschreiben können⁷. Die Replikation (identische Reduplikation) ermöglicht die unveränderte Weitergabe der in der DNA gespeicherten Information und des spezifischen Musters an- und abgeschalteter Gene bei der Zellteilung (siehe Abbildung 1).

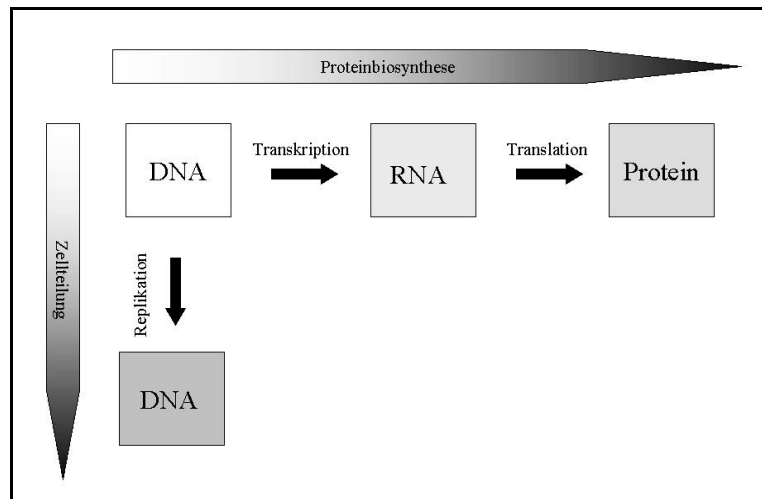


Abbildung 1: Informationsfluss bei der Proteinbiosynthese und der Replikation in Eukaryonten

1.1.1 Einteilung und Aufbau eukaryonter Gene

Ein Gen ist eine funktionelle Einheit des Genoms, das die Information für ein Genprodukt enthält. Man unterscheidet drei Klassen von Genen:

- Klasse-I-Gene kodieren für ribosomale RNA (rRNA), mit Ausnahme von 5S rRNA
- Klasse-II-Gene kodieren für messenger RNA (mRNA)
- Klasse-III-Gene kodieren für transfer RNA (tRNA), small nuclear RNA (snRNA) und 5S rRNA.

Ribosomale RNA bildet den Strukturbaustein der Ribosomen, messenger RNA dient als Matrize bei der Proteinsynthese, die kleeblattartig aufgebaute transfer RNA überträgt die Aminosäuren bei der Proteinsynthese und small nuclear RNA ist ein Bestandteil der für die Reifung der mRNA benötigten Spleißosome. Die tRNA enthält eine Bindungsstelle für Aminosäuren und das als Leseinheit für das entsprechende Kodon der mRNA dienende Antikodon.

Die Klasse-II-Gene unterteilt man in regulierte und nicht-regulierte Gene. Die nicht-regulierten oder konstitutiv exprimierten Gene bezeichnet man auch als Housekeeping-Gene (siehe Abschnitt 1.2).

Die Transkription der unterschiedlichen Genklassen erfolgt mit Hilfe verschiedener RNA-Polymerasen (I, II, III). Polymerasen sind Enzymkomplexe, die aus mehr als zehn Untereinheiten bestehen und zusammen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren die Transkription katalysieren (siehe Abschnitt 1.1.2).

Jedes Gen setzt sich in der Regel aus Promotor, Startkodon, Kodierungssequenz, Stopkodon, Enhancer und Silencer zusammen (siehe Abbildung 2) ⁸.

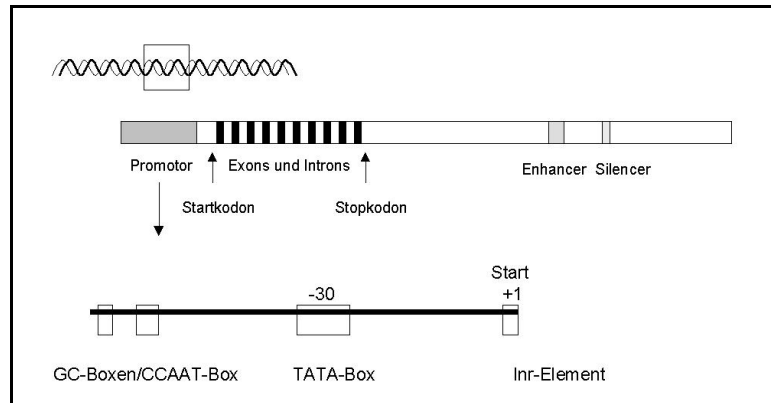


Abbildung 2: Genaufbau bei Eukaryonten

Die Promotorregion ermöglicht die genaue Bindung der RNA-Polymerase am Transkriptionsstartpunkt und gibt Informationen über die Effizienz, mit der ein Gen transkribiert wird ^{9;10}. Häufig enthält sie das Inr-Element, eine Pyrimidin-reiche Sequenz im Bereich des Startkodons ¹¹. In regulierten Genen findet man ungefähr 30 Nukleotide vom Transkriptionsstartpunkt entfernt eine AT-reiche Sequenz, die sogenannte TATA-Box. Sie bestimmt die Transkriptionsgeschwindigkeit und die Genauigkeit des Transkriptionsstarts. In vielen, aber nicht allen Promotoren, kommen sogenannte CCAAT- und GC-Boxen mit der Konsensussequenz GGGCGG in wechselnder Anzahl, Orientierung und Lage zum Transkriptionsstartpunkt vor ⁹. Enhancer und Silencer sind Elemente, die die Genexpression regulieren, in dem sie die Transkription eines Gens verstärken bzw. abschwächen. Sie befinden sich häufig einige hundert Basenpaare von der Promotorregion entfernt.

Gene von Eukaryonten bestehen im Gegensatz zu Prokaryonten aus mehreren kodierenden (Exons) und nicht-kodierenden Abschnitten (Introns). Sowohl Exons als auch Introns werden transkribiert, und es entsteht die sogenannte prä-mRNA. Durch verschiedene Reifungsschritte und das Entfernen der Introns (Spleißing) wird die prä-mRNA in die reife mRNA umgewandelt.

1.1.2 Transkription

Die Transkription ist der erste Schritt der Genexpression. Hierbei wird die Nukleotidsequenz des kodierenden DNA-Abschnittes mit Hilfe von RNA-Polymerasen in die komplementäre Basensequenz der RNA umgeschrieben. Die Transkription proteinkodierender Gene (Klasse-II-Gene) wird durch die RNA-Polymerase II katalysiert. Bei der RNA-Synthese wird anstelle des DNA-spezifischen Zuckers Desoxyribose Ribose eingebaut und Thymin durch Uracil ersetzt. Für die Transkription werden drei Schritte benötigt:

- Initiation
- Elongation
- Termination.

Das größte Problem der Initiation ist das Auffinden der korrekten Startstelle. Die Promotorregion ermöglicht die korrekte Bindung der RNA-Polymerase. Sie bildet zusammen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren den Initiationskomplex. Transkriptionsfaktoren (TF) werden entsprechend ihrer Spezifität für die RNA-Polymerasen I, II, III als TFI_I, TFI_{II} bzw. TFI_{III} bezeichnet.

Der Transkriptionsfaktor TFI_{II} setzt sich zusammen aus dem TATA-Bindeprotein (TBP) und TBP assoziierten Faktoren (TAF). TFI_{II} erkennt die TATA-Box und bindet die Transkriptionsfaktoren TFI_I und TFI_I. Hierdurch wird die exakte Anheftung der RNA-Polymerase II an die DNA ermöglicht. Weitere Faktoren tragen zur Stabilisierung des Initiationskomplexes bei. Durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase zerfällt der Initiationskomplex und die korrekt platzierte RNA-Polymerase wird gelöst. Dieser Vorgang bewirkt den Übertritt in die Elongationsphase ¹².

Während der Elongation wandert die RNA-Polymerase entlang der DNA-Matrize in 5'- 3'- Richtung. Unter Pyrophosphatabspaltung bindet sie komplementäre Nukleosidtriphosphate an den kodogenen Strang und verknüpft diese zum primären Transkriptionsprodukt, die prä-mRNA. Die RNA-Synthese erfolgt bis zum Erreichen einer Stopsequenz. Dieses Terminationssignal bewirkt die Ablösung der RNA-Polymerase. Anschließend steht die abgelöste RNA erneut zur Transkription bereit ⁸.

Aus der nicht funktionsfähigen prä-mRNA entsteht durch verschiedene Modifikationsschritte die fertige mRNA ¹³. Zu diesem sogenannten RNA-Processing zählt neben dem Spleißen das Anhängen einer Cap-Struktur (7-Methylguanosin-Rest) an das 5'- Ende der mRNA und das Hinzufügen einer Poly-AMP-Sequenz (100-200 Basen) an das 3'- Ende der mRNA ¹⁴.

Spleißen bezeichnet das enzymatische Herausschneiden der nicht-kodierenden Introns durch Endonukleasen und das Zusammenfügen der kodierenden Exons mit Hilfe von Ligasen. Dieser Vorgang erfolgt an den aus snRNA aufgebauten Spleißosomen ¹⁵.

1.1.3 Translation

Unter Translation versteht man die Übersetzung der transkribierten DNA in die Aminosäuresequenz der Proteine. Sie findet außerhalb des Zellkerns an den Ribosomen statt. Die mRNA muss für die Translation aus dem Zellkern in das Zytosol transportiert werden. Die Translation erfolgt in drei Schritten:

- Initiation
- Elongation
- Termination.

Eukaryote Ribosomen setzen sich aus einer großen und einer kleinen Untereinheit zusammen. Die große Untereinheit besteht aus ribosomaler RNA mit den Sedimentationskonstanten 28S, 5,8S und 5S, die kleine Untereinheit besteht aus ribosomaler RNA mit der Sedimentationskonstante 18S.

Die Initiation beginnt mit der Bildung eines 80S-Initiationskomplexes. Dies erfolgt durch Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit an das Startkodon der mRNA (Triplett AUG), Anlagerung eines tRNA-Startmoleküls und Bindung der großen ribosomalen Untereinheit. Für diesen Vorgang werden verschiedene Initiationsfaktoren sowie Mg^{2+} und GTP benötigt.

Während der Elongationsphase wird die mit der passenden Aminosäure (entsprechend dem Kodon der mRNA) beladene tRNA angelagert. Die Aminosäure(n) der vorherigen tRNAs werden mit Hilfe von Peptidyltransferasen und Ribozymen übertragen und verknüpft. Anschließend wird die nun leere tRNA abgelöst und das Ribosom entlang der mRNA um die Länge eines Triplets bewegt. Der Elongationszyklus wiederholt sich bis zum Erreichen eines Stopkodons. Für die Elongation werden neben Peptidyltransferase und Ribozymen verschiedene Elongationsfaktoren sowie Mg^{2+} und GTP benötigt.

Drei verschiedene Stopkodons (UAG, UAA, UGA) signalisieren das Ende der Translation. Da es keine entsprechende tRNA gibt, wird die Peptidkette in Gegenwart verschiedener Terminationsfaktoren hydrolytisch von der tRNA gespalten. Das Ribosom dissoziiert in die beiden Untereinheiten. Durch verschiedene Modifikationsschritte wird die Peptidkette in ihre biologisch aktive Form umgewandelt ¹⁶.

1.1.4 Regulation der Genexpression

Die Regulation der Genexpression findet auf verschiedenen Ebenen statt. Sie ist Voraussetzung für eine zell- bzw. gewebsspezifische Differenzierung und erlaubt die Anpassung der Zelle an geänderte Umweltbedingungen. Gleichzeitig können auch pathobiochemische Reaktionen wie maligne Transformationen durch Genregulation verursacht werden. Mechanismen der Genregulation sind:

- Aktivierung und Inaktivierung der Genstruktur^{17;18}
- Initiation und Hemmung der Transkription
- Prozessierung des Transkripts^{19;20}
- Regulation des Transports der mRNA ins Zytoplasma²¹
- Abbau und Translation der mRNA²²
- Aktivierung und Deaktivierung von Proteinen²³.

Die Transkription stellt den wichtigsten Kontrollpunkt der Genregulation dar²⁴. Es hat sich gezeigt, dass fast jedes Gen einen eigenen spezifischen Regulationsmechanismus aufweist. Man unterscheidet *cis*- und *trans*-aktivierende Faktoren²⁵. *Cis*-aktivierende Faktoren beeinflussen Gene auf dem gleichen Chromosom. Zu ihnen zählt man Enhancer und andere in der Nähe des Gens lokalisierte Kontrollelemente. Enhancer beschleunigen die Transkription. Oft befinden sie sich einige hundert Basenpaare ober- oder unterhalb der Promotorregion. Die Orientierung des Enhancers zum Promotor ist unwesentlich. Häufig findet man palindromische (identische Basensequenz der Einzelstränge in 5'-Richtung) oder gleichartig bzw. sehr ähnliche, wiederholte Sequenzen²⁶. Silencer reduzieren im Gegensatz zu den Enhancern die Transkriptionsrate, können diese aber vermutlich nicht vollständig hemmen²⁷. *Trans*-aktivierende Faktoren wirken eher auf weit entfernt liegende Gene oder andere Chromosomen. Hierzu gehören z.B. Transkriptionsfaktoren. In der Regel kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Transkriptionsfaktoren, induzierbaren regulierenden Proteinen und bestimmten DNA-Sequenzen im Bereich des Promotors oder anderen Regulationselementen. Die gebundenen Proteine können den Aufbau und die Funktion des Initiationskomplexes beeinflussen und zu einer Änderung der Transkriptionsgeschwindigkeit führen. Die Transkriptionsfaktoren unterteilt man in allgemeine und spezifische bzw. regulatorische Faktoren²⁵.

Allgemeine Faktoren sind eine Voraussetzung für die exakte Initiation der Transkription (siehe Abschnitt 1.1.2), spezifische Faktoren regulieren dagegen nur wenige Gene eines Organismus. Die spezifischen Faktoren enthalten in der Regel mindestens drei Domänen, die folgende Funktionen erfüllen:

- Bindung eines aktivierenden Liganden
- Bindungsstelle für DNA
- Aktivierung des Initiationskomplexes.

Die Ligandenbindungsdomäne ist aufgrund der Vielfalt möglicher Liganden sehr spezifisch. Die DNA-Bindungsdomäne bildet dagegen häufig wiederkehrende Motive, wie das Zinkfinger-Motiv, das Leucin-Zipper-Motiv und das Helix-Loop-Helix-Motiv²⁸.

Bei der Genregulierung spielt nicht nur die Aktivierung, sondern auch die Hemmung der Transkription eine Rolle. Die Mechanismen der Transkriptionshemmung sind vielfältig. Neben den oben erwähnten Silencern gibt es auch inhibitorisch wirkende Transkriptionsfaktoren^{29;30}. Transkriptionsfaktoren können auf ihrem Weg vom Zytosol (Syntheseort) in den Nukleolus (Wirkungsort) behindert werden. Dieser Mechanismus ist für den Transkriptionsfaktor Nuclear-Faktor-kappaB (NF- κ B) gut untersucht³¹. Weiterhin können DNA-Bindungsstellen blockiert, Proteine von der Bindungsstelle verdrängt oder die Transaktivierung beeinflusst werden. Die vielfältige Anzahl von Regulationsmechanismen ermöglicht eine sehr diffizile Regulierung der Transkription²⁴.

Die Methylierung der DNA stellt eine weitere wichtige Möglichkeit der Genregulierung dar. Hierbei kommt es zur kovalenten Bindung von Methylresten, in der Regel an der C5-Position des Cytosins. Bevorzugt werden Cytosinreste innerhalb der Basensequenz 5'-CpG-3' methyliert³². Durch die Methylierung können verschiedene DNA-bindende Proteine nicht anheften, außerdem werden Bindungsstellen durch Proteine mit höherer Affinität zu methylierter DNA blockiert. Es kommt zu einer unspezifischen Unterdrückung der Transkription³³. Vermutlich führt die Methylierung zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität der Histone. Dies führt zu einer dichteren Packung des Chromatins und zur Inaktivierung der Genstruktur³⁴. Unmethylierte DNA-Abschnitte werden dagegen verstärkt exprimiert³⁵⁻³⁷. Die auf diese Art und Weise entstehenden Methylierungsmuster des Genoms können bei der Replikation der DNA durch das Enzym DNA-Methyl-Transferase weitergegeben werden. Unterschiede im Methylierungsmuster sind für das sogenannte „genomic imprinting“ verantwortlich.

Hierunter versteht man das Phänomen, dass gleiche Allele paternaler und maternaler Gene unterschiedlich exprimiert werden. Es gibt allerdings auch stark methylierte Gene, die exprimiert und nicht-methylierte Gene, die überhaupt nicht exprimiert werden³⁷⁻³⁹. So konnte z.B. an verschiedenen Tumorzellen gezeigt werden, dass die Methylierung der DNA eine Induktion der Expression bewirkt³⁹.

1.2 Housekeeping-Gene

Als Housekeeping-Gene bezeichnet man diejenigen Gene, die nicht reguliert sind, dass heißt unabhängig von Umwelteinflüssen in allen Zellen konstant exprimiert werden. In der Regel kodieren sie für Enzyme, die der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dienen, für Proteine des Zytoskeletts, für rRNA und für Histone²⁷. Beispiele für Housekeeping-Gene sind Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Cyclophilin, Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) und rRNA.

Der Aufbau von Housekeeping-Genen unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von regulierten eukaryonten Genen. Der Promotor nicht-regulierter Gene weist folgende Merkmale auf:

- ein INR-Element im Bereich des Transkriptionsstartpunkts
- das Fehlen einer TATA-Box
- ein hoher Anteil von GC-Basenpaaren und das häufige Vorkommen von GC-Boxen
- die Anhäufung sogenannter CpG-Inseln mit der Dinukleotidsequenz CpG
- häufiges Fehlen der CCAAT-Boxen

Die TATA-Box ermöglicht einen genauen Start der Transkription und erhöht die Aktivität des Promotors (siehe Abschnitt 1.1.1 und 1.1.2). Häufig findet man daher in Housekeeping-Genen mehrere eng beieinander liegende Startpunkte. Hier übernimmt das INR-Element die Funktion der TATA-Box. Der Transkriptionsfaktor TFII-I erkennt den Initiator, ermöglicht die Bindung von TFII-D an den TATA-losten Promotor und fördert den Aufbau des Initiationskomplexes. Sp1 ist ein Protein, das an GC-Boxen bindet. Es besitzt ein Zinkfinger-Motiv und fördert den Aufbau des Initiationskomplexes⁴⁰. In Housekeeping-Genen hilft es den Faktor TFII-D richtig zu platzieren^{38,41}.

Als CpG-Inseln bezeichnet man einige hundert Basenpaare umfassende Abschnitte der DNA, die eine signifikante Häufung unmethylierter CpG-Folgen aufweisen.

CpG-Folgen sind charakteristisch für Promotoren von Housekeeping-Genen⁴². Die Dinukleotid-Sequenz CpG kommt mit etwa einem Fünftel der Häufigkeit vor, die man aufgrund der Basenzusammensetzung erwarten würde. Ursache hierfür ist vermutlich ein Selektionsprozess. Cytosin ist in CpG-Folgen meist methyliert (siehe Abschnitt 1.1.4). Methylcytosin kann durch hydrolytische Deaminierung in Thymin überführt werden. Dieser Austausch von Cytosin gegen Thymin ist nicht reparabel und führt zu einer Häufung von Mutationen. CpG-Folgen sind daher Orte erhöhter Mutationsraten, sogenannte Hot Spots⁴¹.

Ungeklärt ist die Frage, warum CpG-Inseln trotz ihres Methylierungspotentials durch den hohen Anteil von Cytosin in der Regel unmethyliert sind. Eine Hypothese ist, dass CpG-Inseln ein unpassendes Substrat für die DNA-Methyltransferase darstellen. Gegen diese Hypothese spricht, dass methylierte CpG-Inseln auf dem inaktiven X-Chromosom und beim genomic imprinting vorkommen. Außerdem scheint die Methylierung von CpG-Inseln eine Rolle beim Altern und der Tumorgenese zu spielen. Weiterhin könnten komplexe Proteine die Methylierung verhindern, indem sie im Bereich der CpG-Inseln binden, oder Demethylasen aktiv die Methylierung unterbinden⁴³.

Ein neuer Erklärungsversuch beruht auf Untersuchungen, die nicht nur die Rolle von CpG-Inseln bei der Transkription, sondern auch ihre starke Aktivität in Zellen der Keimbahn und ihre Kolokalisierung zu Ursprüngen der Replikation belegen. CpG-Inseln könnten innerhalb von aktiven Promotoren, die als Replikationsursprung in frühen Stadien der Entwicklung dienen, entstanden sein. Das Fehlen bestimmter Komponenten im Initiationsstadium der Replikation könnte Ursache für die Anreicherung von Cytosin und Guanin sein und erklären, warum Cytosin im Bereich der CpG-Inseln unmethyliert vorliegt. Housekeeping-Gene als Gene, die in allen Zellen exprimiert werden, weisen daher unmethylierte CpG-Inseln auf. Andere regulierte Gene, die in frühen Entwicklungsstadien nicht exprimiert werden und daher nicht als Replikationsursprung dienen, wären vor Methylierung nicht geschützt⁴³.

Ein weiteres Merkmal von einigen Housekeeping-Genen ist ihre Anordnung in Clustern. Für das Genom von Prokaryonten ist gezeigt worden, dass funktionell zusammengehörige Gene oft zusammengefasst sind. Für Eukaryonten wurde angenommen, dass ihre Gene eher zufällig verteilt sind. Allerdings liegen die Gene für 18S-, 5,8S- und 28S-rRNA auch bei Eukaryonten in Clustern und wiederholen sich hintereinander. Dies gilt ebenso für die Anordnung von Histongenen⁴⁴.

Ein neueres Modell geht davon aus, dass die Anordnung in Clustern nur für Housekeeping-Gene gilt. Das scheinbare Auftreten von Clustern hochexprimierter Gene wird als Folge der Clusterbildung bei Housekeeping-Genen betrachtet ⁴⁵.

1.2.1 Anwendung als interner Standard

Wie schon berichtet, beschäftigen sich viele Forschungsarbeiten mit der Expression von Genen in unterschiedlichen Zellen unter verschiedenen Bedingungen. Wichtige Methoden, die die Quantifizierung spezifischer mRNA ermöglichen, sind Northern Blot, Ribonuklease-Protektion-Assay und quantitative „Real-Time“-PCR. Alle Verfahren erfordern eine Standardisierung des gemessenen Signals, um Messfehler bei der spektrophotometrischen Quantifizierung, Ungenauigkeiten beim Pipettieren oder RNA-Verlust beim Übertragen auf Membranen auszugleichen. Hierzu wird der Quotient aus der Expression des untersuchten und der Expression eines Standardgens gebildet. Ein abnehmender Quotient entspricht einer Abnahme, ein zunehmender Quotient entspricht einer Zunahme der Expression des untersuchten Gens.

Unter der Annahme, dass Housekeeping-Gene unabhängig von Umwelteinflüssen in allen Zellen stabil exprimiert werden, verwendet man sie als internen Standard für die Quantifizierung von mRNA.

1.2.2 Probleme bei der Anwendung

Entgegen der Annahme, dass Housekeeping-Gene unabhängig von äußeren Einflüssen in allen Zellen stabil exprimiert werden, zeigen eine Vielzahl von Untersuchungen die Regulierung verschiedener Housekeeping-Gene ⁴⁶. Hypoxie und Zellproliferation, führen zu einer veränderten Expression von einigen klassischen Housekeeping-Genen ⁴⁷⁻⁵¹. Andere Untersuchungen geben Hinweise auf intra- und interindividuelle Unterschiede in der Expression verschiedener Housekeeping-Gene ^{52;53}. Gemessene Unterschiede in der mRNA-Expression könnten daher Folge einer veränderten Expression des untersuchten Gens und/oder einer veränderten Expression des verwendeten Housekeeping-Gens sein. Dies erfordert die Überprüfung, welches Housekeeping-Gen unter den spezifischen experimentellen Bedingungen als Kontrollgen geeignet ist.

Obwohl es eine Vielzahl von Veröffentlichungen zur Genexpression bei Hypertrophie und Herzinsuffizienz gibt, liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Untersuchungen zur Expression von Housekeeping-Genen bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz vor.

1.2.3 Typische Housekeeping-Gene

1.2.3.1 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

GAPDH ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse, das in allen Zellen exprimiert wird. Es katalysiert die Oxidierung bzw. Dehydrierung und gleichzeitige Phosphorylierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Diphosphoglycerat. NAD^+ dient dabei als Oxidationsmittel und nimmt den bei der Reaktion freigesetzten Wasserstoff auf⁵⁴.

GAPDH setzt sich aus vier identischen Untereinheiten mit einer Größe von 37 kDa zusammen, die ein Tetramer bilden. Es besitzt eine N-terminale Domäne, die für die Bindung des Co-Faktors NAD^+ verantwortlich ist, und eine mittlere Domäne, die das katalytische Zentrum bildet. Hier erfolgt die kovalente Bindung des Substrats und des anorganischen Phosphats an der Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes⁵⁴.

Die Gensequenz von GAPDH ist in den verschiedenen Spezies sehr ähnlich, was auf eine hohe Konservierung des Enzyms während der Evolution hinweist. Trotzdem gibt es eine Vielzahl von Genvarianten, die mit einer unterschiedlichen Enzymaktivität einhergehen. In der Regel handelt es sich um Punktmutationen⁵⁴. GAPDH wird von Genen auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert (1, 2, 4, 6, 12, X). Es besitzt im Bereich des 5'-Endes eine CpG-Insel, die im aktiven und inaktiven X-Chromosom unterschiedlich methyliert ist. Genomanalysen zeigten drei Klassen von GAPDH-Sequenzen. Klasse 1 (Huhn) enthält eine Kopie des GAPDH-Gens, Klasse 2 (Mensch, Hase, Meerschwein, Hamster) besitzt eine geringe Anzahl von Wiederholungen des Gens und Klasse 3 (Maus, Ratte) besitzt über 200 Kopien⁵⁴.

Unabhängige Studien weisen eine Vielzahl von weiteren Funktionen des GAPDH-Proteins nach^{54;55}. Beispiele hierfür sind die Mitwirkung beim Transport und der Fusion von Membranen sowie der Endozytose. GAPDH scheint eine Rolle bei der Regulation von mRNA, dem Export von tRNA und der Replikation bzw. Reparatur von DNA zu spielen.

Vermutlich steht GAPDH im Zusammenhang mit der Initiierung der Apoptose, dem programmierten Zelltod, sowie der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer ⁵⁶. Weitere neu entdeckte Eigenschaften des GAPDH-Proteins sind die Phosphotransferase- und -kinase-Aktivität und die Interaktion mit Stickstoff ⁵⁷.

GAPDH galt lange Zeit als klassisches Housekeeping-Gen und wird häufig als interner Standard für die Quantifizierung von mRNA verwendet.

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen, die eine Änderung der Genexpression von GAPDH zeigen. Zellproliferation führt zu einer erhöhten GAPDH-Expression ⁵¹. Lungenkarzinom- und hepatische Karzinomzellen exprimieren vermehrt GAPDH ^{49;58}. Die Stimulation von Endothelzellen durch Stickstoff verursacht eine Erhöhung der GAPDH-Synthese ⁵⁹. Der Hypoxia-Inducible Faktor 1 (HIF-1) bewirkt bei Sauerstoffentzug eine Steigerung der Expression von GAPDH ⁴⁷. Reduzierte Nahrungszufuhr vermindert die Expression von GAPDH in Zellen des Pankreas und des oberen Gastrointestinaltraktes ⁶⁰.

Diese Untersuchungen zeigen, wie wenig man über die Funktion und Regulation von GAPDH weiß und wie wichtig daher die Überprüfung der Expression von GAPDH und anderen Housekeeping-Genen unter den spezifischen experimentellen Bedingungen ist, bevor sie als Kontrollgen verwendet werden.

1.2.3.2 Cyclophilin

Cyclophilin bindet das immunsuppressiv wirkende Cyclosporin A und hemmt dessen Aktivität. Es gehört zu der Gruppe der Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen, die mit für die Faltung und Isomerisation von Proteinen verantwortlich sind. Es wird in allen Zellen reichlich exprimiert und kommt sowohl frei als auch membrangebunden vor. Cyclophilin ist ein hochkonserviertes Gen, welches verschiedene Isoformen aufweist. Das Säugetiergenom enthält ca. 20 Kopien von Sequenzen unterschiedlicher Cyclophiline ⁶¹.

Cyclophilin gehört zu den Housekeeping-Genen und wurde in den letzten Jahren immer häufiger als Standardgen zur RNA-Normalisierung verwendet ^{62;63}. Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien und Gewebetypen zeigten, dass die mRNA-Level von Cyclophilin im Vergleich zu GAPDH stabiler sind ⁶⁴.

Hitzeschock und Hypoxie führen jedoch zu einer signifikanten Induktion von Cyclophilin ^{48;65}. Man vermutet eine funktionelle Assoziation zwischen Cyclophilin und spezifischen Hitzeschockproteinen.

Außerdem scheint Cyclophilin eine Rolle bei der Entstehung von Ischämie-Reperfusionsschäden des Myokards zu spielen. Mitochondriales Cyclophilin ist ein Bestandteil mitochondrialer, kalziumabhängiger Kanäle, die den Proteintransport durch die Mitochondrienmembran ermöglichen. Die irreversible Öffnung dieser Kanäle z.B. bei erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen und oxidativem Stress verursacht vermutlich Reperfusionsschäden und programmierten Zelltod. Die genauen Mechanismen sind noch nicht bekannt, aber eine regulative Wirkung von Cyclophilin als Bestandteil dieser Kanäle konnte nachgewiesen werden^{48;65}.

1.2.3.3 Porphobilinogen-Desaminase (PBGD)

PBGD ist ein Schlüsselenzym der Porphyrinsynthese. Es katalysiert die Desaminierung und Polymerisation von vier Porphobilinogen-Molekülen zu linearem Tetrapyrol, das sofort mittels Uroporphyrinogen-III-Synthetase in das ringförmige Uroporphyrinogen III umgewandelt wird. Vergleiche verschiedener Organismen zeigen eine Konservierung der Proteinstruktur zwischen den verschiedenen Spezies. Beim Menschen befindet sich das Gen für PBGD auf dem Chromosom 11. Das PBGD-Gen besitzt zwei Promotoren und kodiert für das erythrozyten-spezifische Isoenzym (42kDa) und das ubiquitäre Isoenzym (44kDa). Der Promotor der erythrozytenspezifischen Isoform weist strukturelle Ähnlichkeiten mit dem β -Globin-Gen auf. Der Promotor für das ubiquitäre Enzym enthält eine Bindungsstelle für Sp1, die charakteristisch für Housekeeping-Gene ist^{66;67}.

PBGD ist ein pseudogenfreies Housekeeping-Gen. Pseudogenfrei bedeutet, es gibt keine homologen, angrenzenden Gene, die für nicht funktionsfähige Proteine kodieren. Pseudogene können durch reverse Transkription von mRNA oder durch Duplikation von Genen, die durch Mutation ihre Funktionsfähigkeit verloren haben, entstehen⁴⁴. In 23 verschiedenen Zellhomogenisaten der Ratte (z.B. Hepatozyten, Kardiomyocyten, Endothelzellen), sowie in spezifisch durch Laser ausgewählten Zellen wurde mit Hilfe von RT-PCR gezeigt, dass die mRNA-Expression des pseudogenfreien Housekeeping-Gens konstant ist⁶⁷. PBGD wird daher von einigen Autoren als Standardgen für die mRNA-Quantifizierung empfohlen. Andere Untersuchungen an verschiedenen Nephronabschnitten der Ratte haben dagegen wesentlich höhere PBGD-mRNA-Level in Tubulus-Homogenisate als in Glomeruli-Homogenisaten nachgewiesen⁶⁸.

Da nur sehr wenige Veröffentlichungen zur Regulation von PBGD vorliegen, sollte die Expression von PBGD vor der Anwendung als Kontrollgen genau überprüft werden.

1.2.3.4 18S-ribosomale-RNA (18SrRNA)

Die ribosomale RNA (rRNA) macht ungefähr 80% der Gesamt-RNA aus. 18SrRNA ist am Aufbau der kleinen 40S-Untereinheit der eukaryontischen Ribosomen beteiligt. Gene, die für rRNA kodieren, kommen im Säugetier in mehr als 100 Kopien vor. Dies ermöglicht die gleichzeitige Transkription mehrerer Gene. Die Gene für 18S, 5,8S und 28SrRNA liegen in Clustern und wiederholen sich. Cluster werden durch Spacer unterschiedlicher Länge getrennt, die nicht transkribiert werden. Sie befinden sich im Bereich der Nukleoli und sind häufig auf verschiedenen Chromosomen verteilt. Ihre Transkription erfolgt mit Hilfe der RNA-Polymerase I. Der Promotor von rRNA-Genen ist sehr einfach aufgebaut. Er besteht aus dem proximalen Promotor-Element und dem UCE (upstream control element). An beiden Elementen bindet der UBF (upstream binding factor). Er bildet zusammen mit dem Transkriptionsfaktor IB (TFIB) und der RNA-Polymerase I den Initiationskomplex^{41;44;69}.

Aufgrund des hohen Anteils von rRNA an der Gesamt-RNA geht man davon aus, dass die Menge der ribosomalen RNA nur sehr geringe Schwankungen aufweist⁴⁶. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die rRNA-Expression im Vergleich zu anderen Housekeeping-Genen relativ konstant ist. Im hepatozellulären Karzinom, in kultivierten Hautfibroblasten und bei Hypoxie ist die Expression von 28SrRNA im Gegensatz zu anderen Housekeeping-Genen unverändert^{47;49;70}. Das Gleiche gilt für die Expression von 18SrRNA in kultivierten Hautfibroblasten und in Zellen des Pankreas bzw. oberen Gastrointestinaltraktes bei Nahrungsentzug^{60;70}. Häufig wird daher die Anwendung von rRNA als interner Standard zur Quantifizierung von mRNA empfohlen^{46;62}.

Andere Untersuchungen weisen dagegen Änderungen der Expression von rRNA nach. Es ist gezeigt worden, dass es in leukämischen Zellen zu Störungen im RNA-Metabolismus kommt^{71;72}. Leukämische CD38+-Zellen besitzen im Vergleich zu normalen Knochenmarkzellen ein signifikant niedrigeres Level von 18SrRNA⁷³. Ein weiteres Beispiel ist die Erniedrigung der rRNA-Expression aufgrund von Degradation einiger rRNA-Spezies als Folge von Hitzeschock⁷⁴.

1.3 Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz

Hypertrophie ist definiert als das Wachstum von Geweben oder Organen durch Zunahme des Zellvolumens bei gleichbleibender Zellzahl. Sie wird durch Anpassung an eine physiologische Mehrbelastung oder eine pathologische Überlastung verursacht ⁷⁵.

Als Herzinsuffizienz bezeichnet man die Unfähigkeit des Herzens, trotz ausreichenden venösen Rückstroms und normalen enddiastolischen Ventrikeldrucks ein für den Bedarf des Organismus ausreichendes Herzzeitvolumen zu fördern und den venösen Rückstrom aufzunehmen ⁷⁶.

Eine akute Herzinsuffizienz, z.B. ausgelöst durch akuten Verlust kontraktile Fasern infolge eines Myokardinfarkts, kann eine kompensatorische Hypertrophie der noch vitalen Kardiomyozyten verursachen. Aber auch eine bestehende Herzhypertrophie kann bei anhaltendem Stimulus wie Druck- oder Volumenbelastung zur Herzinsuffizienz führen.

1.3.1 Ätiologie

Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, das durch eine Vielzahl kardialer und extrakardialer Störungen verursacht oder begünstigt wird. Ursachen können eine Verminderung der myokardialen Kontraktilität, eine unphysiologische Erhöhung der Vorlast (Volumenbelastung), eine unphysiologische Erhöhung der Nachlast (Druckbelastung) oder Erkrankungen, die zu einer Behinderung der diastolischen Füllung des Herzens führen, sein. Häufige Erkrankungen, die zu Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz führen können, sind Koronare Herzerkrankung, Hypertonie und Myokardinfarkt ⁷⁷.

1.3.2 Kompensationsmechanismen

Die herabgesetzte Förderleistung des Herzens aktiviert im gesamten Organismus eine Vielzahl struktureller und neurohormonaler Kompensationsmechanismen, die den Blutdruck und das zirkulierende Blutvolumen trotz verminderter Pumpleistung aufrechterhalten sollen, aber letztendlich durch einen Circulus vitiosus zu einer Progredienz der Herzinsuffizienz führen ⁷⁸.

Zu diesen Kompensationsmechanismen gehören die kardiale Hypertrophie, der Frank-Starling-Mechanismus sowie die Aktivierung von Katecholaminen, Endothelin, Vasopressin und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) einerseits bzw. von natriuretischen Peptiden, Adrenomedullin, Prostaglandinen und Bradykinin andererseits.

Die kardiale Hypertrophie führt zur Zunahme der kontraktilen Masse. Die Zunahme des Herzgewichts wird durch Verlängerung der einzelnen Kardiomyozyten und Zunahme der Myofibrillen verursacht. Man unterscheidet die durch Volumenbelastung bedingte exzentrische und die durch Druckbelastung bedingte konzentrische Hypertrophie. Ziel der Hypertrophie ist die Normalisierung der bei insuffizienten Herzen nach dem Laplace'schen-Gesetz erhöhten systolischen Wandspannung⁷⁹. Ab einem sogenannten kritischen Herzgewicht ist die Versorgung der Koronararterien mit Sauerstoff eingeschränkt. Außerdem kommt es durch Gefügedilatation zur weiteren Abnahme der Leistungsfähigkeit.

Der Frank-Starling-Mechanismus bewirkt die Anpassung der kardialen Auswurfleistung an veränderte hämodynamische Bedingungen in Abhängigkeit vom enddiastolischen Ventrikelvolumen. Die Kontraktilität nimmt proportional zur Sarkomerlänge zu. Als Ursache hierfür wird die längenabhängige Zunahme der Kalzium-Sensitivität des Troponin-C gesehen⁷⁹⁻⁸². Auch der Frank-Starling-Mechanismus wirkt nur bis zu einem gewissen Grad der Dehnung der Sarkomere. Beim Überschreiten einer kritischen Länge wie bei massiv dilatierten Ventrikeln nimmt die Kontraktilität wieder ab.

Katecholamine, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), Endothelin und Vasopressin dienen der Aufrechterhaltung einer adäquaten Perfusion lebenswichtiger Organe. Durch Vasokonstriktion und Wasserretention tragen sie vor allem im akuten Stadium der Herzinsuffizienz zur hämodynamischen Kompensation bei. Erhöhte Katecholamin-, Angiotensin-II und Endothelinkonzentrationen verursachen jedoch auch eine kardiale Hypertrophie und führen langfristig zur Progredienz der Herzinsuffizienz. Es entwickelt sich ein Circulus vitiosus aus neuroendokriner Aktivierung, Vasokonstriktion, Wasserretention und progredienter Abnahme der linksventrikulären Pumpfunktion⁷⁹.

Natriuretische Peptide, Adrenomedullin, Prostaglandine und Bradykinin können durch ihre vasodilatorische und diuretische Wirkung der Vasokonstriktion und Wasserretention entgegenwirken. Darüber hinaus ist für die natriuretischen Peptide eine antihypertrophe Wirkung beschrieben worden⁸³. Im Verlauf der Herzinsuffizienz kommt es zum zunehmenden Wirkverlust der natriuretischen Peptide, dessen Ursache bisher unklar ist.

Diskutiert werden eine Downregulation der natriuretischen Peptidrezeptoren und die Inhibition ihrer Signaltransduktion.

Infolge des deutlichen Übergewichts der vasokonstringierenden, wasserretinierenden und wachstumsauslösenden Systeme kommt es letztendlich zur Progredienz der Erkrankung (siehe Abbildung 3).

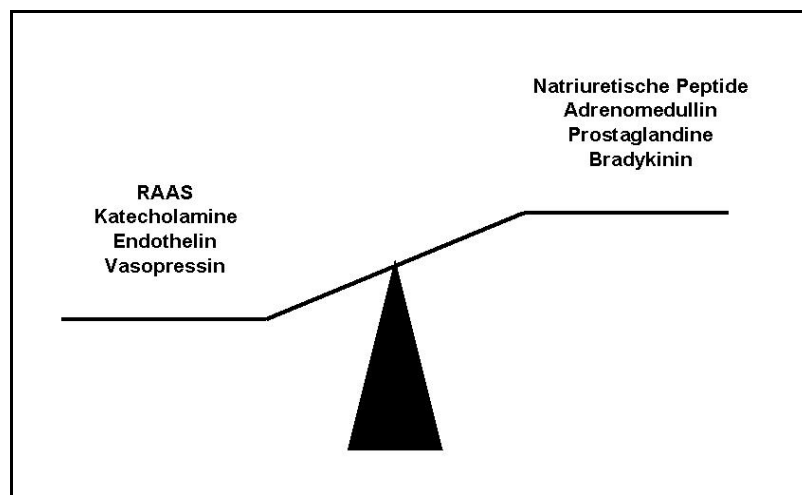


Abbildung 3: Neuroendokrine Aktivierung bei Herzinsuffizienz

1.3.3 Regulation der Genexpression

Hypertrophie und Herzinsuffizienz führen zu qualitativen und quantitativen Änderungen der Genexpression. Hierbei kommt es zur Aktivierung des „fetalen Genexpressionsprogrammes“. Es wurde gezeigt, dass die Umstellung des Genexpressionsmusters eher durch eine verminderte Expression adulter Gene als eine vermehrte Expression fetaler Gene erfolgt⁸⁴. Die Reaktivierung des fetal Genexpressionsprogramms stellt einen Anpassungsmechanismus an die verminderten Energieressourcen dar. Es kommt zur veränderten Expression verschiedener Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels. Enzyme der β -Oxidation werden vermindert, Enzyme des Glukosestoffwechsels vermehrt exprimiert. Wie beim fetalen Herz stellen Kohlenhydrate die Hauptenergiesubstrate zur ATP-Synthese dar⁸⁴.

Weitere Beispiele für die Umstellung auf das fetale Expressionsmuster sind Aktin, Myosin, Teile des regulatorischen Troponinkomplexes sowie die Na-K-ATPase.

Bei der kardialen Hypertrophie der Ratte kommt es zum Myosin-Isoform-Shift der drei Formen des Myosins (V1, V2, V3). V1 stellt die erwachsene Isoform da und besitzt eine hohe ATPase-Aktivität, V3 ist die fetale Isoform und besitzt eine niedrige ATPase-Aktivität. Im Myokard von Kontrolltieren wurde vor allem V1, im mittelgradig hypertrophierten Myokard alle drei Isoformen und im stark hypertrophierten Myokard vor allem V2 und V3 exprimiert.

Die kardiale Hypertrophie ist außerdem gekennzeichnet durch eine regulative Induktion verschiedener Protoonkogene und Stressproteine, wie insulin like growth factor (IGF), platelet derived growth factor (PDGF), endothelial growth factor (EGF) und Tumornekrosefaktor (TNF) ⁸⁵⁻⁸⁷. Sie binden an den Tyrosinkinaserzeptor, der durch Autophosphorylierung eine Signaltransduktionskaskade in Gang setzt, die letztendlich durch Phosphorylierung der sogenannten Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK) an der Regulation von Wachstum und Differenzierung beteiligt ist. Es kommt zu Veränderungen der kontraktilen Proteine und zu einer zunehmenden Fibrosierung.

Insgesamt kommt es bei Hypertrophie zu einer generellen Zunahme von RNA und Proteinen in der Zelle. Eine konstante mRNA-Konzentration pro Gesamt-RNA bedeutet also letztendlich eine absolute Zunahme der mRNA.

Die Expression der natriuretischen Peptide ist abhängig vom Schweregrad der Herzinsuffizienz. Zu den natriuretischen Peptiden (NP) werden das atriale natriuretische Peptid (ANP), das Brain natriuretic peptide (BNP), das C-Typ-natriuretische Peptid (CNP) und das Dendroaspis-natriuretische Peptid (DNP) gezählt. Diese Peptidhormone besitzen untereinander Strukturhomologien und weisen ein ähnliches Wirkungsspektrum auf ^{88,89}. ANP und BNP sind kardiale Hormone mit natriuretischen, vasodilatatorischen und Aldosteron-inhibierenden Eigenschaften. ANP zeigt bereits bei der kompensierten Herzinsuffizienz einen maximalen Anstieg der mRNA-Expression, während die BNP-mRNA-Expression unverändert ist. Erst bei der manifesten Herzinsuffizienz wird auch die BNP-mRNA-Expression induziert, die ANP-mRNA-Synthese bleibt im Vergleich zur kompensierten Herzinsuffizienz unverändert hoch. Als Ursache für die vom Schweregrade der Herzinsuffizienz unabhängige ANP-mRNA-Expression wird ein negativer Autofeedbackmechanismus diskutiert ⁹⁰.

Die Plasmakonzentrationen von ANP und BNP sind proportional zum Schweregrad der Herzinsuffizienz. Beide dienen als Marker einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion, dabei ist jedoch BNP gegenüber ANP hinsichtlich der Spezifität überlegen ⁹¹.

1.3.4 Atriales natriuretisches Peptid (ANP)

ANP ist ein Peptidhormon aus der Familie der natriuretischen Peptide, das 1981 von de Bold et al. im Vorhof von Ratten entdeckt wurde⁹².

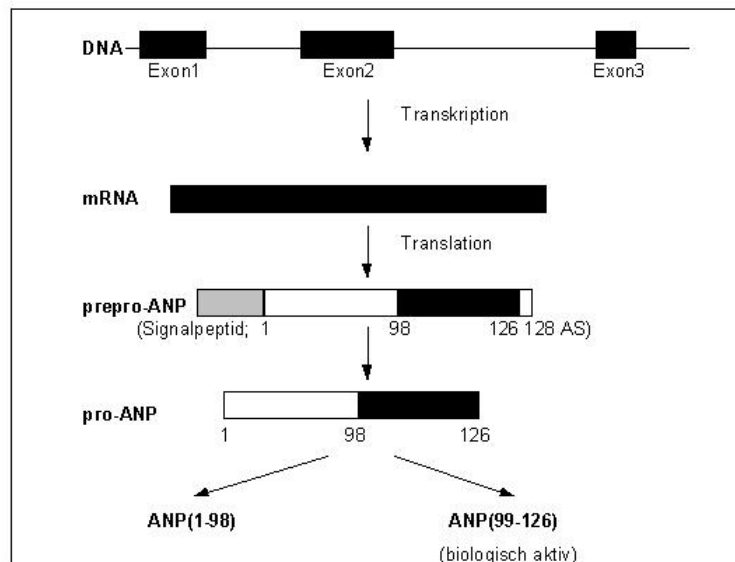


Abbildung 4: Synthese von ANP

ANP wird auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 kodiert. Das Gen für ANP besteht aus 3 Exons. Abhängig von der Spezies liegt nach der Translation ein unterschiedlich langes präpro-ANP vor, das die Vorstufe von pro-ANP und ANP ist⁹³⁻⁹⁷. Das humane präpro-ANP besteht aus 151 Aminosäuren (AS), das der Ratte aus 153 AS. Charakteristisch für präpro-ANP ist ein 24 AS langes Signal-Peptid am N-terminalen Molekülende, das für den Transport von präpro-ANP über die Membran des endoplasmatischen Retikulums abgespalten werden muss. Das präpro-ANP der Ratte enthält darüber hinaus zwei zusätzliche Carboxylgruppen am C-terminalen Molekülende^{98;99}. Durch Abspaltung des Signalpeptides und der zwei Carboxylgruppen wird das präpro-ANP(1-126) in das pro-ANP umgewandelt. Pro-ANP stellt die Hauptspeicherform des ANP in den atrialen Granulae dar^{98;100;101}. Erst durch Spaltung des Moleküls (1-126) entsteht das biologisch aktive ANP(99-126) und das inaktive N-terminale ANP(1-98) (siehe Abbildung 4). An der Position 105 und 121 befindet sich jeweils die Aminosäure Cystein. Sie bilden eine intramolekulare Disulfidbrücke, die charakteristisch und notwendig für die biologische Aktivität der natriuretischen Peptide ist^{98;102}.

Hauptsyntheseort von ANP sind die Atrien^{100;103;104}. Dort wird das pro-Hormon in Form von 250-500nm großen Granulae gespeichert^{100;103}. Die Konversion zum biologisch aktiven ANP(99-126) erfolgt wahrscheinlich während der Ausschüttung in den Kreislauf.

Als erstes pro-ANP konvertierendes Enzym konnte die kardial exprimierte Typ-II Serin-Protease Corin identifiziert werden¹⁰⁵. Adäquater Reiz für die akute Ausschüttung von ANP ist die Dehnung der Vorhöfe durch Volumenbelastung. Für die ANP-Freisetzung spielen darüber hinaus ein lokaler Konzentrationsanstieg von Endothelin-1 und Angiotensin-II sowie ein Konzentrationsabfall von NO eine Rolle¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.

ANP-mRNA wird in den Atrien gesunder adulter Tiere in höherer Menge als in den Ventrikeln synthetisiert. Während der Embryogenese ist das Verhältnis genau umgekehrt: in dieser Entwicklungsphase sind die Ventrikel Hauptsyntheseort für ANP¹¹⁰. Wie bei der fetalen ANP-Expression kommt es bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz zur gesteigerten ventrikulären ANP-Expression. ANP-mRNA eignet sich aufgrund seiner bekannten Regulation als Marker kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz¹¹¹.

2. Ziel der Arbeit

Die Untersuchung der Genregulierung spielt eine große Rolle beim Verständnis biologischer Abläufe. Wichtige Methoden für die Quantifizierung von mRNA sind Northern Blot, Ribonuklease Protektion Assay und quantitative „Real-Time“-PCR (TaqManTM-PCR). Diese Verfahren erfordern zum Ausgleich von Messfehlern die Standardisierung des gemessenen Signals.

Housekeeping-Gene sind Gene, die nicht reguliert sind, das heißt unabhängig von Umwelteinflüssen in allen Zellen konstant exprimiert werden. In der Regel kodieren sie Enzyme, die der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dienen, Proteine des Zytoskeletts, ribosomale RNA und Histone. Housekeeping-Gene, wie Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Cyclophilin, Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) und 18SrRNA, werden aufgrund ihrer konstitutiven Expression als interner Standard verwendet.

Vielen Untersuchungen belegen allerdings, dass Housekeeping-Gene unter verschiedenen Bedingungen wie Hypoxie und Zellproliferation reguliert werden können. Bei der Quantifizierung der mRNA-Expression ist es daher notwendig, ein für die spezifischen experimentellen Bedingungen geeignetes Kontrollgen zu finden.

Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz sind begleitet von ausgeprägten Änderungen in der Expression verschiedener Gene wie z.B. ANP. Häufig werden für die Untersuchung der kardialen Genexpression ebenfalls Housekeeping-Gene als interner Standard angewendet. Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen keine Studien zur differenziellen Expression von Housekeeping-Genen bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz vor.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der linksventrikulären mRNA-Expression der häufig verwendeten Housekeeping-Gene GAPDH, Cyclophilin, PBGD und 18SrRNA, um einen geeigneten internen Standard zur kardialen mRNA-Expressionsanalyse bei experimenteller Herzhypertrophie und -insuffizienz in der Ratte zu finden.

3. Material und Methoden

3.1 Tierexperimente

3.1.1 Tierhaltung und Tierzahlen

Alle Tierversuche (*Genehmigungsbescheid G 0262-96*) wurden an männlichen Wistar-Ratten (*Fa. Moellegard, Schönwalde*) durchgeführt, die mit handels- und tierüblichem Futter (*Ssniff Experimentalfutter für Ratten, Fa. Ssniff, Soest*) versorgt wurden und freien Zugang zum Trinkwasser hatten. Das präoperative Gewicht lag zwischen 230 und 250 Gramm. Die Tiere wurden bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Operationen sowie die Blut- und Organentnahme erfolgten zwischen 7 und 12 Uhr. Während der Operation und der hämodynamischen Messungen wurden die Tiere auf einem Wärmekissen bei konstanter Körpertemperatur (37°C) gehalten.

Für die Untersuchungen am Shunt-Modell wurden jeweils 12 Tieren je Gruppe (Kontrolle, kleiner Shunt und großer Shunt) verwendet. Im Infarkt-Modell umfasste die Kontrollgruppe 13 und die Infarktgruppe 9 Tiere.

3.1.2 Induktion der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz

Als Modell für Herzhypertrophie dienten Ratten mit kleinem aortokavalen Shunt. Als Modell für Herzinsuffizienz wurden zum einen Ratten mit großem aortokavalen Shunt, zum anderen Ratten mit experimentell induziertem Infarkt, hervorgerufen durch Ligation der LAD (left anterior descending artery = Ramus interventricularis anterior), verwendet.

3.1.2.1 Shunt-Operation

Die Anlage des aortokavalen Shunts erfolgte durch eine leicht modifizierte Technik, die erstmals von Garcia und Diebold beschrieben wurde (siehe Abbildung 5)¹¹².

Nach erfolgter Äther-Narkose wurden die Tiere laparotomiert und die Aorta abdominalis sowie die Vena cava inferior im Bereich zwischen Abgang der Arteriae renales und der Aortenbifurkation dargestellt. Die Aorta abdominalis wurde unterhalb des Abgangs der Arteriae renales abgeklemmt und mit einer Venenpunktionskanüle durchstoßen.

Die Kanüle wurde anschließend bis in das Lumen der Vena cava inferior vorgeschoben, danach zurückgezogen und die Punktionsstelle der Aorta mit Zyanoacrylatkleber (*Instant Krazy Glue, Borden Company, Willowdale, Ontario, Kanada*) verklebt⁹⁰. Die so entstandene Verbindung zwischen der Vena cava und der Aorta induzierte eine Volumenbelastung, die zur Entwicklung von kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz führte. Für den kleinen Shunt wurden Strauß-Kanülen (*Braun, Melsungen*) mit einem äußeren Durchmesser von 1,2 mm (Herzhypertrophie) und für den großen Shunt Kanülen mit einem Durchmesser von 1,8 mm (Herzinsuffizienz) verwendet. Visuell konnte der Erfolg der Shunt-Operation durch das Anschwellen der Vena cava inferior und die durch Beimischung arteriellen Blutes hellere Farbe beurteilt werden. Anschließend erfolgte der Verschluss des Operationssitus durch Muskel- und Hautnaht (*Perma-Hand Seide, 3-0, Ethicon, Norderstedt*). Die Kontrolltiere wurden analog den Shunttieren operiert; es wurde nur auf die Anlage des aortokavalen Shunts verzichtet.

Die perioperative Mortalität der Kontrolltiere und der Tiere mit kleinem Shunt betrug weniger als 1 %, die perioperative Mortalität der Tiere mit großem Shunt weniger als 5 %. Die weitere Untersuchung der Tiere (Hämodynamik, RNA-Analysen) erfolgte 30 Tage nach Anlage des Shunts.

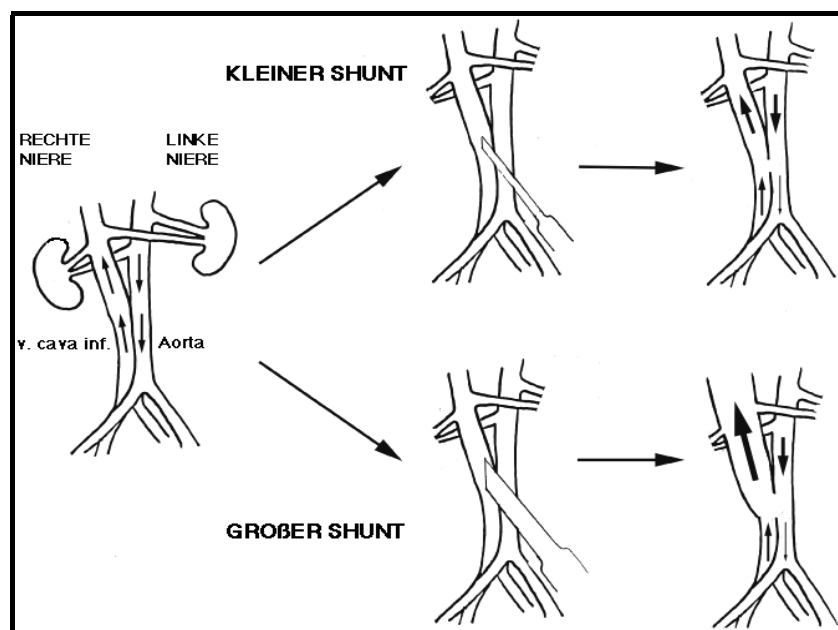


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Anlage eines kleinen und großen Shunts

3.1.2.2 Myokardinfarkt-Induktion

Die experimentelle Induktion des Myokardinfarkts erfolgte durch Ligation des Ramus interventrikularis anterior (RIVA/LAD). Hierzu wurde eine abgewandelte, ursprünglich von Pfeffer et al. beschriebene Methode verwendet¹¹³.

Die Tiere wurden mit Chloralhydrat anästhesiert und mit einem 1,2 mm breiten PE-Katheter intubiert und beatmet (*V5K6 Respirator, Narco Bio-Systems Inc*). Nach Thorakotomie und Freilegung der LAD wurde diese zwischen dem pulmonalen Ausflusstrakt und dem linken Atrium mit Ethibond 7/0 (*Ethicon*) ligiert. Die perioperative Mortalität betrug in den ersten 48 Stunden 56%. Die Kontrolltiere wurden analog operiert; es wurde nur die Ligation der LAD nicht durchgeführt.

3.1.3 Hämodynamische Messungen

Nach Anästhesie durch intraperitoneale Injektion von Chloralhydrat (*400mg/kg Körpergewicht, Sigma-Aldrich, Steinheim*) wurden die rechte Vena jugularis externa und die rechte Arteria carotis communis präpariert und ein Katheter (*PE-50 Mikroschlauch, NeoLab, Heidelberg*) eingeführt. Mittels Druckaufnehmer (*P23XL, Statham, Viggo-Spectramed, Oxnard, Kalifornien, USA*) und Verstärker (*Pressure Processor AMP 4600, Gould, Dietzenbach*) wurden nach entsprechender Katheterpositionierung der arterielle, der zentralvenöse sowie der linksventrikuläre systolische und enddiastolische Druck gemessen. Die Messung des LVEDP erfolgte R-Zacken getriggert, durch Abgleich von Druckkurve und parallel aufgezeichnetem EKG. Die linksventrikuläre Kontraktilität wurde als Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) mittels eines Differentiators (*DIF 4600, Gould, Dietzenbach*) berechnet.

Anschließend wurde das Herz entnommen, in DEPC-Wasser (*0,2 % Diethylpyrocarbonate, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*) gespült, die Herzen in Atrien und Ventrikel separiert, gewogen und die Infarktgröße planimetrisch bestimmt. Nach Entfernung des nekrotischen Gewebes wurden die Organe bis zur weiteren Analyse nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C aufbewahrt. Für die RNA-Expressions-Bestimmungen wurden nur vitale Bereiche des linken Ventrikels verwendet.

3.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Für die RNA-Quantifizierung wurden zum einen das Ribonuklease-Protektion-Assay (RPA) und zum anderen die TaqManTM-PCR verwendet. Beide Methoden unterscheiden sich im Ablauf und in ihrer Sensitivität.

Der RPA ist eine Methode zur Detektion und Quantifizierung von RNA (siehe Abbildung 6).

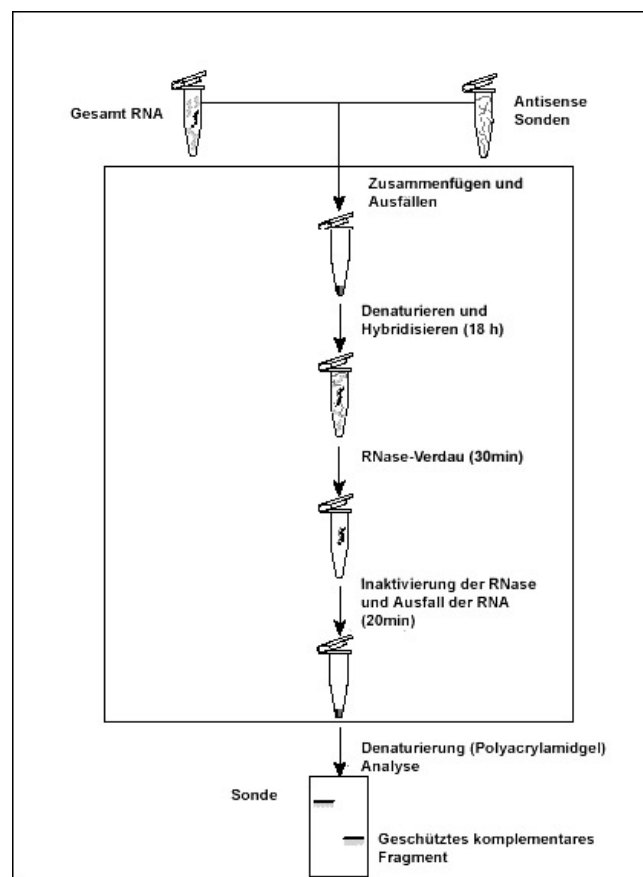


Abbildung 6: Ablauf des Ribonuklease-Protektion-Assay (aus Instruction Manual RPA IIITM von Ambion)

Prinzip des RPA ist: Radioaktiv-markierte RNA-Sonden, die komplementär zu Abschnitten der zu untersuchenden RNA sind, hybridisieren mit diesen Abschnitten der RNA. Unhybridisierte RNA-Einzelstränge werden mit Hilfe von Ribonuklease abgebaut. Die doppelsträngigen, mit den Sonden hybridisierten Abschnitte sind dagegen vor dem Abbau durch Ribonuklease geschützt.

Durch elektrophoretische Auftrennung im Polyacrylamidgel können die gebundenen radioaktiv-markierten Sonden mit Hilfe der Autoradiographie dargestellt und quantifiziert werden. Folgende Schritte sind für die Untersuchung der Genexpression mittels RPA notwendig:

- RNA-Extraktion und Quantifizierung
- Herstellung spezifischer RNA-Sonden
- Durchführung des RPA.

Vorteil dieser Methode ist, dass eine Degradation der RNA außerhalb der Region, wo die Sonde hybridisiert, keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Außerdem bietet der RPA die Möglichkeit, gleichzeitig verschiedene Sonden anzuwenden. Diese müssen sich lediglich in ihrer Größe so unterscheiden, dass sie durch ein Polyacrylamidgel voneinander abgrenzbar sind.

Die TaqMan™-PCR ist ein neues, sehr sensitives, spezifisches und schnelles Verfahren. Hierbei wird eine aus Oligonukleotiden bestehende, fluorogene Sonde verwendet, deren 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist und deren 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt. Außerdem ist sie mit einem Phosphatrest blockiert. Der Quencher unterdrückt aufgrund der räumlichen Nähe zum Reporter-Farbstoff den Fluoreszenz-Energietransfer in der intakten Sonde. Während der PCR hybridisiert die Sonde zusammen mit den Primern an den Matrizenstrang (siehe Abbildung 7, Bild 1). Während der Extensionphase bewirkt die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA Polymerase die Hydrolysierung der Sonde (siehe Abbildung 7, Bild 2). Hierdurch werden Quencher und Reporter getrennt (siehe Abbildung 7, Bild 3) und die Fluoreszenz des Reporters steigt mit zunehmender Akkumulation des PCR-Produktes (siehe Abbildung 7, Bild 4). Das Signal ist strikt sequenzspezifisch. Mit Hilfe eines Sequenzdetektors kann Zyklus für Zyklus („Real-Time“) die Veränderung der Fluoreszenz im geschlossenen Reaktionsgefäß erfasst werden ¹¹⁴.

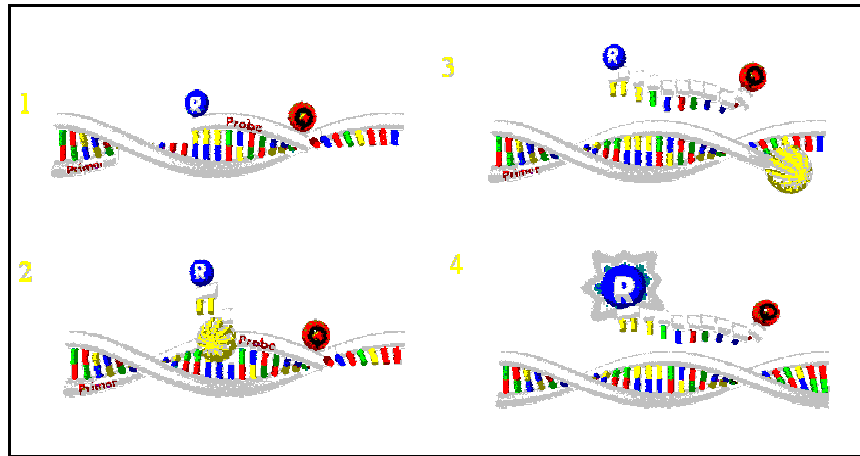


Abbildung 7: Ablauf der TaqManTM-PCR (aus Einführung in Real-Time TaqManTM PCR-Technologie)

Während der PCR kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des gesuchten Moleküls, wodurch die Quantifizierung innerhalb der logarithmischen Phase der Reaktion ermöglicht wird. Selbst geringe Schwankungen der Startmolekülzahl, die am Ende der Reaktion in der Plateauphase ein einheitliches Niveau erreichen, können bereits während der exponentiellen Zunahme erkannt und mit Hilfe von Standards quantifiziert werden. Weitere Vorzüge der TaqManTM-PCR sind neben dem schnellen Vorliegen quantitativer Ergebnisse das Arbeiten im geschlossenen Gefäß, das Entfallen zeitintensiver Gelelektrophoresen im Anschluss an die PCR sowie die Automatisierung der Methode, die einen hohen Probendurchlauf ermöglicht. Durch Quantifizierung der mRNA mit unterschiedlichen Detektionsverfahren soll untersucht werden, ob die Wahl der Detektionsmethode einen Einfluss auf das Ergebnis der mRNA-Expression-Messung hat und ob dies bei der Wahl eines geeigneten Housekeeping-Gens zu berücksichtigen ist.

3.2.1 Extraktion und Quantifizierung der RNA

Für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen wurden alle verwendeten Reaktionsgefäße und Materialien vor der Benutzung autoklaviert bzw. mit 70% Ethanol (Merck KG, Darmstadt) und DEPC-Wasser (0,2 % Diethylpyrocarbonate, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) gereinigt und gespült. Es wurde nur autoklaviertes DEPC- bzw. RNase/DNase freies Wasser (Promega GmbH Mannheim, Deutschland) benutzt¹¹⁵.

3.2.1.1 RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA des linken Ventrikels wurde aus dem Myokard nach der Single-Step-Extraktionsmethode von Chomczynski und Sacchy (*Guanidiniumisothiocyanate-Phenol-Chloroform*) isoliert ¹¹⁶. Prinzip der Methode ist die RNA-Extraktion durch Denaturierung der im Gewebe vorliegenden Endonukleasen, Trennung von RNA und Proteinen sowie die Ausfällung der RNA.

Für die Inaktivierung von Endonukleasen werden Substanzen wie Guanidiniumthiocyanat (*Biotechnology Grade, Amresco®, Solon, USA*), Phenol (*Amresco®, Solon, USA*) und Mercaptoethanol (*Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*) verwendet. Guanidiniumthiocyanat ist ein Salz, das Proteine effektiv denaturiert und inaktiviert. Dies führt auch zur Zerstörung der RNAsen. Die denaturierende Wirkung wird durch Mercaptoethanol verstärkt. Mercaptoethanol spaltet intramolekulare Disulfidbrücken in Proteinen ¹¹⁵. Die Trennung von RNA und Proteinen erfolgt durch die unterschiedliche Löslichkeit in Phenol und der verminderten Löslichkeit der RNA in Isopropanol/Ethanol.

Die RNA-Extraktion erfolgte nach folgendem Protokoll: Das noch tiefgefrorene und gewogene Gewebe wurde in 1ml/100mg Gewebe eiskalter Denaturierungslösung (4M Guanidine Thiocyanate; 25mM Natriumcitrat pH 7,0, *Amresco®, Solon, USA*; 0,5 % N-Lauryl-Sarcosine, *Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*; 100mM 2-Mercaptoethanol) gebracht und mit dem Ultra-Turrax T25 (*Janke & Kunkel IKA-Laborgeräte*) homogenisiert, bis keine Partikel mehr sichtbar waren. Je 1ml Denaturierungslösung wurden 0,1ml 2M Natriumacetatlösung (pH 4,0; *Merck KG, Darmstadt*) und 1ml Phenol /Chloroform:Isoamyl-Alkohol (49:1, *Merck KG, Darmstadt*) hinzugefügt. Nach Zugabe jedes Reagens wurden die Proben kurzzeitig durchmischt und für 15 Minute auf Eis gestellt.

Natriumacetat senkt den pH-Wert so, dass neben den Proteinen auch kleinere DNA-Fragmente im Phenol gelöst werden. Größere DNA-Fragmente lagern sich durch Zentrifugation in der Interphase. Die Proben wurden 10 Minuten bei 11.500g und 4°C zentrifugiert. Der wässrige, die RNA enthaltene, Überstand wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt, ein äquivalentes Volumen Isopropanol (*Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*) hinzugefügt, die Proben gut durchmischt und eine Stunde bei -80°C gelagert. Hierdurch erfolgte die Fällung der an Natriumacetat gebundenen RNA.

Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 10.000g und 4°C war die RNA als kleines Pellet am Boden des Reagenzgefäßes sichtbar. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Pellets in 0,3ml Denaturierungslösung vollständig aufgelöst. Ein zweites Mal wurde die RNA wie oben beschrieben mit 0,3ml Isopropanol gefällt, die Pellets vorsichtig zwei Mal mit 0,5 ml 75 % Ethanol gewaschen, für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, in 50µl RNase freies Wasser aufgelöst und bei –80°C aufbewahrt.

3.2.1.2 RNA-Quantifizierung

Die RNA-Quantifizierung erfolgte spektralphotometrisch mit dem Gene Quant II. Das Gerät misst die Extinktion bei 260nm (Absorptionsmaximum von RNA) sowie 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) und berechnet die RNA-Konzentration nach folgender Formel:

$$c[\mu\text{g/ml}] = \text{Extinktion bei 260 nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ (RNA-Multiplikationsfaktor)}$$

Zu beachten ist, dass die Extinktion zwischen 0,1 und 1 liegen sollte, da nur in diesem Bereich Extinktion und Konzentration proportional zueinander sind. Eine Aussage über die Reinheit der RNA kann über das Verhältnis Extinktion bei 260nm zu Extinktion bei 280 nm gemacht werden. Dieser Quotient sollte für eine reine Nukleinsäurelösung zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Alle untersuchten Proben erfüllten dieses Kriterium.

Die Quarzküvette wurde vor jeder Messung mit Ethanol und DEPC-Wasser gereinigt. Es erfolgte ein Nullabgleich mit Wasser, anschließend wurden die mit DEPC-Wasser 1:100 verdünnten Proben quantifiziert.

3.2.1.3 Denaturierende Gelelektrophorese der RNA

Die Gelelektrophorese dient der Überprüfung der Intaktheit der RNA und der Kontrolle der Konzentrationsmessung. Für das 1,2%iges Agarose-Gel wurde 0,5g Agarose (*Biotechnology Grade, Amresco®, Solon, USA*) in 36ml DEPC-Wasser gelöst.

Nach Abkühlen des Gels auf 60°C wurden 5ml 10xMOPS (50mM Natriumacetat; 200mM MOPS, Analytical Grade, *Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg*; 10mM Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA), Analytical Grade, *Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg*; pH=7,0) und 9ml Formaldehydlösung (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen*) hinzugefügt, anschließend wurde das Gel gegossen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1xMOPS als Pufferlösung gefüllt. Die Proben wurden vor Durchführung der Elektrophorese denaturiert: 2µg RNA und DEPC-Wasser in einem Volumen von 5,7µl wurden mit 1µl 10xMOPS, 3,3µl Formaldehyd, 10µl deionisiertem Formamide (*Biotechnology Grade, Amresco®, Solon, USA*) und 1µl Ethidiumbromid (*Biotechnology Grade, Amresco®, Solon, USA*) für 15 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Formaldehyd und Formamide denaturieren RNA und ermöglichen die elektrophoretische Auftrennung der RNA nach der Moleküllänge. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an RNA bindet und die Darstellung der RNA unter UV-Licht erlaubt. Nach der Inkubationszeit wurden 2µl Gelladepuffer (50 % Glycerol, 1mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau; ACS Grade, *Amresco®, Solon, USA*; 0,25 % Xylen Cyanol FT, *Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*) hinzugefügt und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde durch Anlegen eines elektrischen Feldes (4V je cm Gellänge; Agagel Mini/Maxi Gelelektrophoresekammer, *BIORAD Laboratories, Hercules, USA*) begonnen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert. Auf den Gelfotos sind die Banden für die 18- und 28-S ribosomale RNA erkennbar. Dies kennzeichnet die Intaktheit der RNA ¹¹⁷. Alle untersuchten Proben erfüllten dieses Kriterium (siehe Abbildung 8).

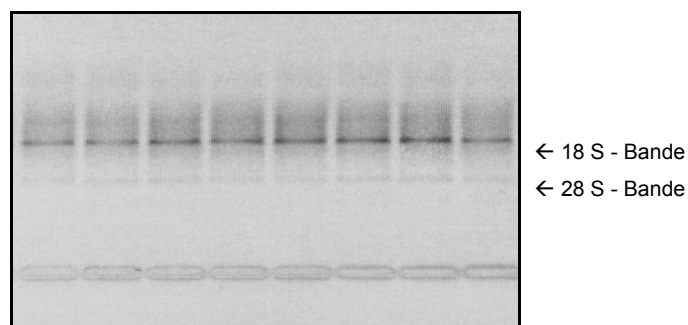


Abbildung 8: Gelelektrophorese der extrahierten RNA

3.2.2 Sondenherstellung

3.2.2.1 Primer-Design

Bei der Sondenherstellung sind verschiedene Kriterien zu beachten. Die Primer-Sequenz sollte spezifisch für das gewünschte Amplifikationsprodukt sein und nicht mehr als vier gleiche aufeinanderfolgende Basenpaare enthalten, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu vermeiden. Die Länge der Primer umfasst ca. 20 Nukleotide mit einem Anteil von Cytosin zu Guanin von 40-60%. Die Schmelztemperatur sollte für Sense- und Antisense-Primer annähernd gleich sein. Inter/intramolekulare Komplementarität sollte vermieden werden. Das Vorhandensein von ein bis zwei G oder C am 3'-Ende ermöglicht eine bessere Bindung und Elongation.

Diese Punkte wurden bei der Auswahl der Primerpaare berücksichtigt. Die gewählten Sonden unterscheiden sich um mindestens 40 Nukleotide, um eine spätere elektrophoretische Auftrennung zu ermöglichen. Die Gensequenzen wurden über Entrez-NCBI (*National Center for Biotechnology, USA*) gesucht [Accessionsnummern: ANP (M60731), GAPDH (AF106860), Cyclophilin (M19533), PBGD (Y17155), 18SrRNA (V01270)]. Die Primer wurden von der Firma *BioTeZ Berlin-Buch GmbH (Robert-Rössle Str.10, 13125 Berlin, Deutschland)* hergestellt (siehe Tabelle 1).

Gen	Produkt-länge	Annealing-Temperatur	Primer forward	Primer reverse
ANP	600 N	61°C	5'-GCGAGACAAGAGAGAGCAGG-3'	5'-CAAAAGCAAGAAATAGGCTATG-3'
GAPDH	303 N	60°C	5'-CCCTGCATCCACTGGTGCTGCC-3'	5'-CATTGAGAGCAATGCCAGCCC-3'
Cyclo	180 N	55°C	5'-TCACGGCTGATGGCGAGCCC-3'	5'-GGCGTGTGAAGTCACCACCC-3'
PBGD	126 N	55°C	5'-ATGTCCGGTAACGGCGGCGCGG-3'	5'-CAGCATCGCTACCACAGTGTGCG-3'
18 S	76 N	60°C	5'-GCCGGTACAGTGAAACTGCG-3'	5'-CCAAGTAGGAGAGGAGCGAG-3'

Tabelle 1: Primerpaare und Annealingtemperatur für ANP und die untersuchten Housekeeping-Gene

3.2.2.2 RT-PCR

Mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-PCR (RT-PCR) lassen sich spezifische RNA-Sequenzen amplifizieren. Durch das Enzym Reverse-Transkriptase erfolgt zunächst die cDNA-Synthese mit der RNA als Matrize. Oligo(dT)-Primer, die im Bereich des Poly-A-Schwanzes (3'-Ende) der RNA hybridisieren, dienen als Startpunkt für die Reverse-Transkriptase. Anschließend wird eine PCR durchgeführt, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient.

Für die cDNA-Synthese wurde in einem Ansatz 3µg der extrahierten RNA, 3µl Oligo-dT-Primer (*StrataScript™RT-PCR Kit, Stratagene, La Jolla, USA*) und DEPC-Wasser in einem Gesamtvolumen von 41µl vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde für 10 Minuten bei 65°C im Thermoblock (*Trio-Thermoblock™, Biometra, Göttingen, Deutschland*) inkubiert und auf 25°C abgekühlt, um die Bindung der Primer an die RNA zu gewährleisten. Anschließend wurden folgende Komponenten (*alle StrataScript™ RT-PCR Kit, Stratagene, La Jolla, USA*) in der hier angegebenen Reihenfolge hinzugegeben: 10µl *First Strand*-Puffer, 45µl Wasser, 2µl 25mM dNTPs, 1µl RNase Block Ribonukleaseinhibitor und 1µl Reverse-Transkriptase. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach dieser Inkubationszeit durch Erwärmen auf 90°C für 5 Minuten abgebrochen.

Die Amplifikation der gewünschten Abschnitte der cDNA erfolgte mittels PCR. Ausgehend von der vorliegenden cDNA wurden durch Verwendung spezifischer Primerpaare, die Anfangs- und Endpunkt der Reaktion bestimmen, DNA-Strang-Duplikate der gewünschten Sequenz synthetisiert. Die Sequenzen für die Primerpaare der entsprechenden Sonden sind in Tabelle 1 aufgeführt. Für die PCR wurden jeweils 10µl cDNA-Lösung mit folgenden Komponenten (*alle StrataScript™ RT-PCR Kit, Stratagene, La Jolla, USA*) gemischt: 10µl 10x Taq DNA polymerase buffer, 0,5µl 25mM dNTPs, 1µl Primer-Set (jeweils 0,5µl Sense-/Antisense-Primer; 0,1µg/µl), 1,0µl DynazymeII (2u/µl) und 77,5µl DEPC-Wasser. Alle Proben wurden mit 75µl Mineralöl (*Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*) überschichtet, um ein Verdunsten des Probeninhaltes zu verhindern. Für jedes Primerpaar lief eine Negativkontrolle mit.

Das Reaktionsgemisch unterlag im Thermoblock folgenden Temperaturen: Denaturierung (Trennung der komplementären Stränge) bei 94°C für 10 Minuten; [Einstellung der spezifischen Annealingtemperatur zur Anlagerung der Primer (siehe Tabelle 1) für 30 Sekunden, Elongation (Strangsynthese) bei 72°C für 60 Sekunden, Denaturierung bei 94°C für 45 Sekunden] für 35 Zyklen; Elongation bei 72°C für 10 Minuten; Beenden der Reaktion durch Abkühlen auf 4°C.

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese in einem 1,6%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid in 1xTE-Puffer (5xTE-Puffer-Stammlösung: 0,45M Tris (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen, Deutschland*), 0,45M Borsäure (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen, Deutschland*), 10mM EDTA, pH 8,0). Die spezifischen Banden wurden unter UV-Licht fotografiert und ausgeschnitten.

Die Gelstücke wurden mit dem *QIAquick Gel Extraktions Kit* (*Qiagen GmbH Hilden, Deutschland*) nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt. Das Gelstück wurde in 300µl/100mg Puffer QG für 10 Minuten bei 50°C vollständig aufgelöst und 100µl/100mg Isopropanol hinzugefügt. Das gesamte Volumen wurde über die *Qiagen*-Säule gegeben, 1 Minute bei 15.500g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden 500µl Puffer QG auf die Säule pipettiert, 1 Minute bei 15.500g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde 750µl Puffer PE auf die Säule pipettiert, zweimal 1 Minute bei 15.500g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurde die Säule in ein steriles Eppendorfgefäß überführt, 30µl Puffer EB in die Mitte der Säule pipettiert, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert, 1 Minute bei 15.500g zentrifugiert und das gereinigte Produkt bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.3 Klonierung

Die Klonierung von PCR-Produkten dient der Herstellung großer Mengen identischer DNA. Hierbei wird die spezifische DNA (Insert) in einen Vektor eingebaut (Ligation), der in Bakterien eingeschleust wird (Transformation) und auf diese Weise vermehrt werden kann. Zur Ligation wurde der *pGEM®-T_{Easy}-Vektor* (*Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*) verwendet. Dieser Vektor enthält Basensequenzen häufiger Restriktionsendonukleasen, ein Ampicillin-Resistenz-Gen und das für β -Galactosidase kodierende *lacZ*-Gen (siehe Abbildung 9).

Bakterien, die dieses Plasmid enthalten, exprimieren das Enzym β -Galactosidase, welches galactosidische Bindungen spaltet und einen blauen Farbstoff bildet. Das lacZ-Gen wird nur exprimiert, wenn kein DNA-Insert dieses Gen unterbricht. Weiße Kolonien enthalten daher das gewünschte Klonierungsprodukt.

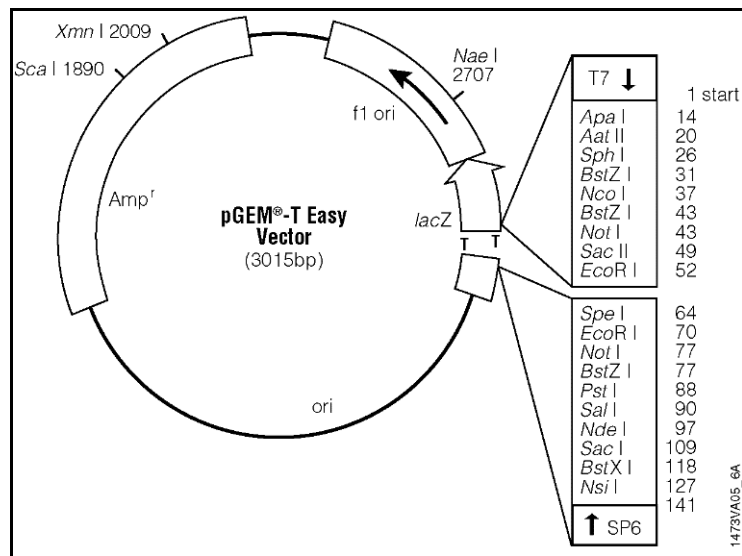


Abbildung 9: pGEM®-T_{Easy}-Vektor

Für die Ligation wurden 7 μ l der gereinigten PCR-Produkte mit 0,1 μ l T-Vektor, 1 μ l Ligationspuffer und 1 μ l T4-DNA-Ligase (*alles Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*) auf Eis gemischt und im Thermoblock für 1 Stunde bei 4°C und anschließend für 24 Stunden bei 16°C inkubiert.

Für die Transformation wurde Luria-Bertani-(LB)-Medium (10g Tryptone, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen, Deutschland*; 5g Hefe-Extrakt, *Merck KG, Darmstadt*, 5g NaCl, 20ml 1 M Tris-HCL (pH7,4) auf 1 Liter destilliertes Wasser) hergestellt. Die Lösung wurde autoklaviert, auf 50°C abgekühlt, 50ml als Transformationslösung abgenommen und 50mg/l Ampicillin (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen, Deutschland*) steril hinzugefügt. Anschließend wurden 10 μ l Ligationsansatz und 50 μ l kompetente JM109-Zellen (*Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze für 45 Sekunden auf 37°C erhitzt (Hitzeschock) und sofort für 3 Minuten auf Eis abgekühlt (Kälteschock). Nach Hinzufügen von 800 μ l Transformationslösung wurden die Ansätze für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt.

Zur Kontrolle wurde die Bakterienlösung auf einer Ampicillin-Agar-Platte ausgestrichen. Für die Platten wurde 8g Agar in 250ml H₂O gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50°C wurde 25mg Ampicillin, 160µl 0,8 M Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid (IPTG) und 10mg 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal) hinzugefügt und luftblasenfrei in Petrischalen gegossen. IPTG induziert die Expression am lac-Promotor, X-Gal ist ein Substrat β-Galactosidase und Ampicillin verhindert das Wachstum von Bakterien, die kein Ampicillin-Resistenz kodierendes Plasmid enthalten. Die mit der Bakterienlösung ausgestrichenen Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Da die Bakterien ein Ampicillin-Resistenz-Gen enthalten, können sie sich auf den Agar-Platten vermehren. Am nächsten Tag wurden mehrere weiße Kolonien gepickt und in 3ml LB-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.2.4. Plasmidpräparation (Minipräparation)

Die Plasmidpräparation erfolgte nach folgendem Protokoll: Zunächst wurde 1ml der Bakteriensuspension mit 1ml Dimethylsulphoxide (*Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*) gemischt und bei –80°C gelagert. Die restlichen 2ml der Bakteriensuspension wurden für 5 Minuten bei 5.000g zentrifugiert, das Pellet in 250µl TE-Puffer+RNase (100:1) aufgenommen, 250µl 1% SDS (*Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*), 1 M NaOH-Lösung (pH 7,2; *Roth GmbH Carl CO Karlsruhe, Deutschland*) hinzugefügt und für 5 Minuten inkubiert. Die Bakterienlösung wurde vorsichtig geschüttelt, 250µl 3M Natriumacetat und 750µl Chloroform hinzu pipettiert, geschüttelt und für 5 Minuten bei 5.000g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Rest verworfen. Nach Hinzufügen von 1ml Isopropanol, wurde die Lösung geschüttelt und für 20 Minuten bei 4°C und 16.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 30µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

Zur Kontrolle erfolgte ein Probeverdau der Plasmide mit dem Restriktionsenzym Not-I (*Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*). Not-I schneidet beidseits des Inserts in den multiplen Kloning-Regionen des pGem®-T_{Easy}-Vektors. In einem Ansatz von 10µl wurden 0,5µl Not-I, 1µl Puffer D, 1µl BSA 1:10 (bovines Serumalbumin) sowie 1µl DNA-Plasmid für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und am Ende für 15 Minuten bei 65°C erhitzt.

Anschließend wurden die erhaltenen Fragmente in einem 1,6% Agarose-Gel aufgetrennt und analysiert. Alle Inserts hatten die erwartete Länge.

3.2.2.5 Sequenzierung

Jedes Plasmid wurde nichtradioaktiv nach der Methode von Sanger sequenziert (*Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit mit 7-deaza-dGTP*)¹¹⁸. Durch die Sequenzierung kann die Richtung der Sequenz festgestellt und kontrolliert werden, dass die richtige Sequenz kloniert wurde.

Für die Einzelreaktionen (A, C, G und T) wurden jeweils 850ng/1kb eingesetzt, ansonsten wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers verfahren. Als Sequenzierungs-Primer wurden IRD-800 markierte Standard-Oligonukleotide (*M13 universal, M13 reverse, SP6, T7, und T3; MWG, Ebersberg*) verwendet. Für die PCR wurden 4µl-Ansätze auf eine dünnwandige 96-Well-PCR-Mikrotiterplatte aufgetragen und mit PCR-Wachs überschichtet. Jeweils 1µl der denaturierten PCR-Produkte wurde in die Geltasche eines 6%igen denaturierenden Acrylamidgels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei 50°C und 34 V je cm (*LI-COR 2000 System; MWG; Ebersberg*) durchgeführt.

Die Detektion der Produkte erfolgte durch kontinuierliche Fluoreszenz-Messung. Die Sequenzauswertung wurde mit Hilfe der *LI-COR-Software* durchgeführt. Alle Plasmide enthielten die richtigen Sequenzen. ANP, GAPDH, Cyclophilin und PBGD wurden in Richtung des T7-Promotors, 18S in Richtung des SP6-Promotors transkribiert. Diese Information benötigt man für die Durchführung der *in vitro*-Transkription der RNA-Sonden für den RPA.

3.2.2.6 Plasmidpräparation (Maxipräparation)

Zur Herstellung einer größeren Menge von Plasmiden wurden 1ml des Bakterien/DMSO-Gemischs über Nacht in 200ml LB-Medium inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte mit Hilfe des *Qiagen-Kits (Qiagen GmbH Hilden, Deutschland)* entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurde die Bakteriensuspension für 20 Minuten bei 4°C und 5.000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in jeweils 4ml Puffer 1 und 4ml Puffer 2 vorsichtig aufgelöst und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Danach wurden 4ml Puffer 3 hinzugefügt und die Suspension für 15 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Lösung für 30 Minuten bei 4°C und 30.000g zentrifugiert. Der Probenüberstand wurde auf die mit 10ml QBT-Puffer gewaschene Säule gegeben und zweimal mit 30ml QC-Puffer gewaschen. Nachdem 15ml QF-Puffer über die Säule gelaufen sind, wurden jeweils 5ml Eluat mit 3.5ml Isopropanol gemischt und die Lösung für 30 Minuten bei 4°C und 15.500g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet dreimal mit 5ml 75% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in DEPC-Wasser aufgenommen.

Die Plasmide von ANP, GAPDH, Cyclophilin und PBGD wurden mit den Restriktionsenzymen Nae-I (*Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*) und Sac-I (*Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*) in Puffer A (*Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*) verdaut. Nae-I schneidet den pGEM®-T_{Easy}-Vektor (3.015N) an der Stelle 2.707 und Sac-I an der Stelle 109. Daher ergibt sich die verdaute Plasmidlänge aus der Sondenlänge plus 417N (ANP 1017 N, GAPDH 720N, Cyclophilin 597N, PBGD 543N) Das 18SrRNA-Plasmid wurden mit Vsp-I (*Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*) und SpH-I (*Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*) in Puffer D (*Promega GmbH, Mannheim, Deutschland*) verdaut. SpH-1 schneidet den Vektor an der Stelle 26 und Vsp-I an den Stellen 288, 347 und 1582. Die Plasmidlänge für 18SrRNA beträgt daher 338N (siehe 3.2.2.4). Die erhaltenen Fragmente wurden in einem 1,6% Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Alle Plasmide enthielten die entsprechenden Inserts (siehe Abbildung 10).

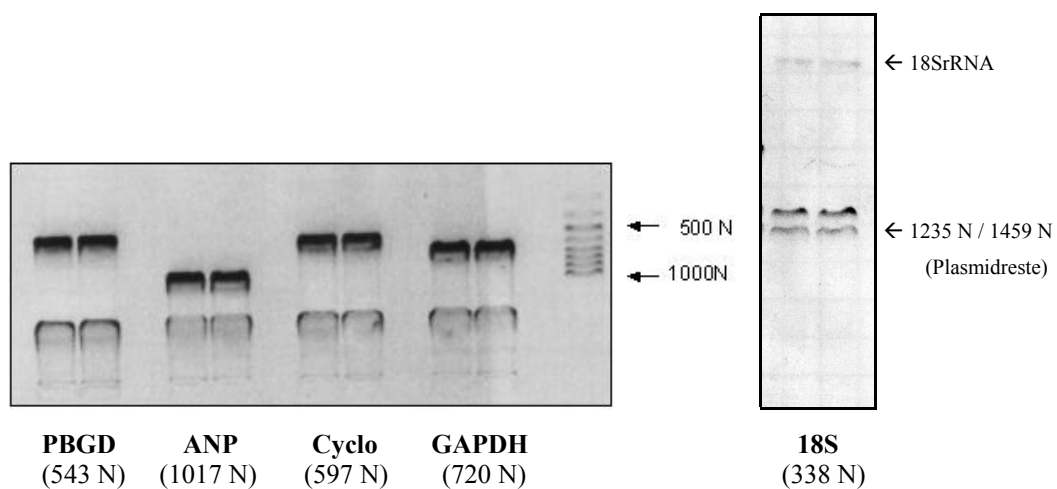


Abbildung 10: Gelelektrophorese des Verdaus der verwendeten Plasmide

Die spezifischen Banden wurden ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraktions Kits* (Qiagen GmbH Hilden, Deutschland) gereinigt (siehe 3.2.2.2).

3.2.2.7 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription dient der Herstellung radioaktivmarkierter RNA-Sonden. Bei der *in vitro*-Transkription synthetisiert eine RNA-Polymerase RNA, wobei DNA als Vorlage dient. Die RNA-Polymerase bindet an einen entsprechenden DNA-Promotor, trennt die doppelsträngige DNA und benutzt den 3'-5' Strang als Vorlage, um einen komplementären 5'-3' RNA-Strang zu synthetisieren. Dabei wird ^{32}P -radioaktives-UTP eingebaut und die Sonde radioaktiv markiert.

Für die *in vitro*-Transkription wurden entsprechend des Protokolls des Herstellers 0,5µg DNA mit 2µl 10xTranskriptionspuffer, 5µl ^{32}P -markiertes-UTP, 2µl RNA-Polymerase (T7; SP6) und jeweils 1µl ATP, CTP, GTP (10mM) in einem Ansatz von 20µl gemischt und bei 37 °C inkubiert (*MAXIscrip-KitTM* der Firma AMBION). Nach einer Stunde wurde 1µl DNase 1 hinzugefügt und nochmals für 15 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 1µl EDTA (0,5 M) wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Sonden mit einem Polyacrylamidgel gereinigt, ausgeschnitten, über Nacht in 300µl Elutionspuffer gelöst und die Radioaktivität bestimmt.

3.2.3 Ribonuklease-Protektion-Assay und Quantifizierung der mRNA-Expression

3.2.3.1 Durchführung des RPA

Für die Durchführung des RPA wurde das *RPA III KitTM* (Ambion; Wiesbaden, Deutschland) verwendet. Am ersten Tag wurden jeweils 2,5µg der extrahierten RNA mit 20µl Hybridization III Buffer vermischt und die jeweiligen markierten Sonden hinzugegeben. Es wurde ein Assay mit den markierten Sonden für ANP (50.000cpm) und PBGD (50.000cpm), GAPDH (30.000cpm) und 18SrRNA (50.000cpm) sowie Cyclophilin (80.000cpm) durchgeführt. Alle Sonden wurden vorher getestet und die optimale Konzentration bestimmt. Hefe-RNA diente als Negativkontrolle.

Die Proben wurden 5 Minuten bei 90°C denaturiert. Durch Inkubation über Nacht bei 42°C (18 Stunden) konnte die RNA mit der komplementären Sonde hybridisieren.

Am nächsten Tag erfolgte die Herstellung eines RNase-Mix durch Hinzufügen von 2,5µl RNase A/T1 auf jeweils 200µl RNase Digestion III Buffer. Um die ungebundene einsträngige RNA zu verdauen, wurde zu den über Nacht inkubierten Proben der RNase-Mix hinzugefügt und die Proben für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Diese Zeit diente zur Vorbereitung eines 8,0% denaturierenden Polyacrylamidgels, hergestellt aus 38,75 ml 9M-Urea (*Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*), 6,25ml 40% Acrylamid (Acryl: bis-Acryl=19:1, *Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*), 5ml 10xTBE-Puffer und 400µl 10% Amoniumpersulfat (*Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*) in dH₂O, 54µl TEMED (*Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*). Nach der Inkubation der Proben wurde die RNase mittels 300µl RNase Inactivation/Precipitation III Lösung inaktiviert und die Proben nochmals für 30 Minuten bei –20°C inkubiert und anschließend die unverdauten RNA-Abschnitte durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 15.500g ausgefällt.

In der Zwischenzeit wurde die Elektrophorese gestartet. Alle Geltaschen wurden mehrmals sorgfältig gespült, um Reste des Harnstoffs zu entfernen. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1xTBE-Puffer verwendet. Der radioaktive Überstand der Proben wurde vorsichtig entfernt und entsorgt. Die Pellets wurden in jeweils 8µl Gel Loading Buffer II aufgelöst, 5 Minuten bei 95°C erhitzt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese lief für 2 Stunden bei 250 V.

3.2.3.2 PhosphorImager

Für die Analyse der radioaktiven Signale wurde der PhosphorImager (*Fujix Bio-Imaging Analyzer BAS 2000*) verwendet. Hierzu wurde das Polyacrylamid-Gel nach der Elektrophorese auf ein Filterpapier transferiert, mit durchsichtiger Plastikfolie abgedeckt, bei 80°C Vakuum-getrocknet und in Abhängigkeit von der Sonde nach 1-3 Stunden auf einer PhosphorImager-Platte entwickelt. Die Länge der einzelnen Sonden und die Länge des entsprechend komplementär bindenden Fragments sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Sonde	Länge der Sonde	Länge des komplementären Fragmentes
ANP	709 N	600 N
GAPDH	412 N	303 N
Cyclophilin	289 N	180 N
PBGD	235 N	126 N
18SrRNA	191 N	76 N

Tabelle 2: Länge der einzelnen Sonden und des komplementären Fragments

3.2.3.3 Analyse und Quantifizierung des RPA

Die Auswertung der autoradiographischen Signale erfolgte anhand der optischen Dichte mit Hilfe der NIH-Image-Software (*National Institute of Health, USA*).

3.2.4 TaqManTM-PCR und Quantifizierung der mRNA-Expression

3.2.4.1 Durchführung der TaqManTM-PCR

Für die Durchführung der TaqManTM-PCR wurde das TaqManTM-PCR Core Reagent Kit (*PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Germany)*) verwendet und das Protokoll des Herstellers berücksichtigt. Jeweils 2µl der cDNA wurden mit 23µl eines Reaktionsgemisches bestehend aus jeweils 2,5µl 10xTaqMan buffer A, 3,5µl Magnesiumchlorid (25mM), jeweils 0,5µl dATP, dCTP, dGTP und dUTP (10mM), jeweils 0,75µl forward und reverse Primer (10µM), 0,75µl der mit 5'-Fam-/3'-Tamra-markierten Sonden (5µM), 0,125µl AmpliTaq Gold (5 U/µl) und 0,25µl AmpErase UNG (1 U/µl). Die TaqManTM-PCR erfolgte mit Hilfe des *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*. Folgende Zyklusparameter wurden verwendet: Enzymaktivierung bei 50°C für 2 Minuten, Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten, 50 Zyklen Denaturierung bei 94°C für 20 Sekunden und anschließend Annealing (Anlagerung) der Primer und Elongation (Strangsynthese) bei 60°C für eine Minute.

Primerpaare und Sonden wurden von der Firma *BioTeZ Berlin-Buch GmbH (Robert-Rössle Str.10, 13125 Berlin, Deutschland)* hergestellt (Sequenzen siehe Tabelle 3).

Gen	Primer forward/Primer reverse	TaqMan-Sonde
ANP	5'-CTT CTT CTT CTT GGC CTT TTG -3' / 5'-GTG TTG GAC ACC GCA CTG TAT AC-3'	5'-Fam- TCC CAG GCC ATA TTG GAG CAA ATC C -Tamra -3'
GAPDH	5'-AAC GAC CCC TTC ATT GAC CTC-3' / 5'-CTT CCC ATT CTC AGC CTT GAC T-3'	5'-Fam- ACC CAC GGC AAG TTC AAC GGC A -Tamra-3'
Cyclo	5'-CCA AGA CTG AGT GGC TGG ATG-3' / 5'-TCC ACA ATG CTC ATG CCT TC-3'	5'-Fam- CAA GCA TGT GGT CTT TGG GAA GGT GAA -Tamra-3'
PBGD	5'-TGG CTC AGA TAG CAT GCA AGA G-3' / 5'-TGG ACC ATC TTC TTG CTG AAC A-3'	5'-Fam- ATG CAG GCC ACC ATC CAG GTC C -Tamra-3'
18 S	5'-CAT TCG TAT TGC GCC GCT A-3' / 5'-TGC TTT CGC TCT GGT TCG T-3'	5'-Fam- AGG TGA AAT TCT TGG ACC GGC GCA -Tamra-3'

Tabelle 3: Verwendete Primerpaare und jeweilige Sonde bei der TaqManTM-PCR

3.2.4.2 Auswertung TaqManTM-PCR

Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte mit Hilfe des C_t-Wertes (Cycle Threshold). Dieser Wert entspricht der Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird. Für die Berechnung wurde die in der Benutzeranleitung #2 des ABI PRIMS 7700 Sequence Detection System beschriebene $\Delta\Delta C_t$ -Methode zur Quantifizierung verwendet.

Die mRNA Expression ergibt sich aus folgender Formel:

$$Gen-mRNA-Expression = 2^{\left(\frac{\sum_{i=1}^n Ct_i - Kontrolle}{n} \right) - Ct-Gen}$$

Die folgenden Bilder zeigen Beispielgraphen der durchgeführten TaqManTM-PCR für ANP und die untersuchten Housekeeping-Gene (siehe Abbildungen 11-15).

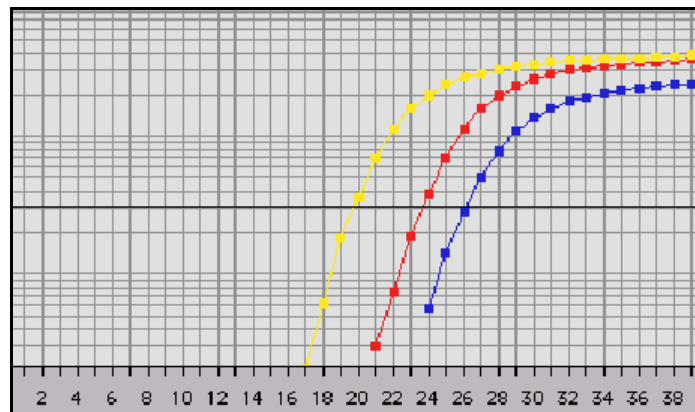


Abbildung 11: Beispielgraphen der ANP-mRNA-Expression im Shuntmodell (• Kontrolle, • kleiner Shunt, • großer Shunt)

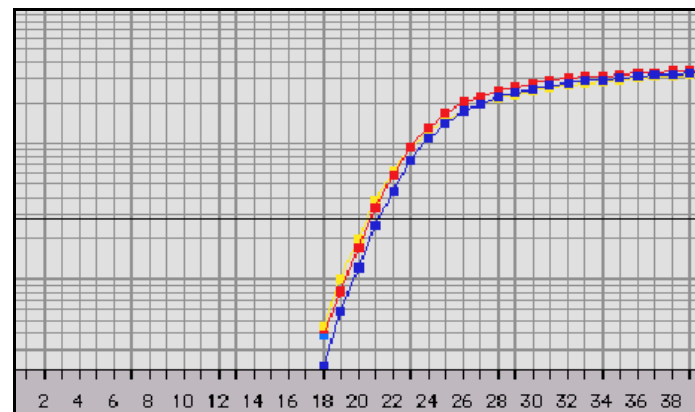


Abbildung 12: Beispielgraphen der GAPDH-mRNA-Expression im Shuntmodell (• Kontrolle, • kleiner Shunt, • großer Shunt)

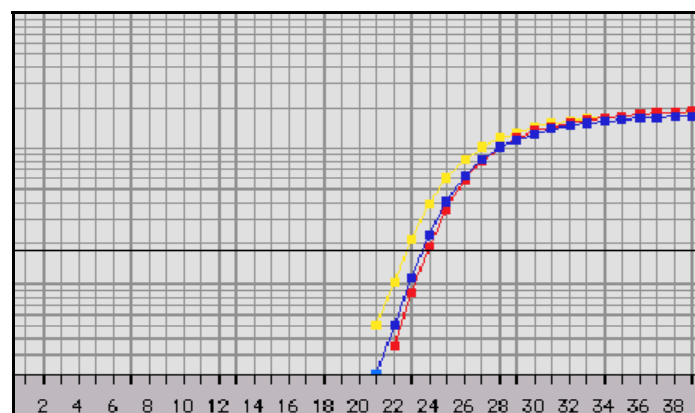


Abbildung 13: Beispielgraphen der Cyclophilin-mRNA-Expression im Shuntmodell (• Kontrolle, • kleiner Shunt, • großer Shunt)

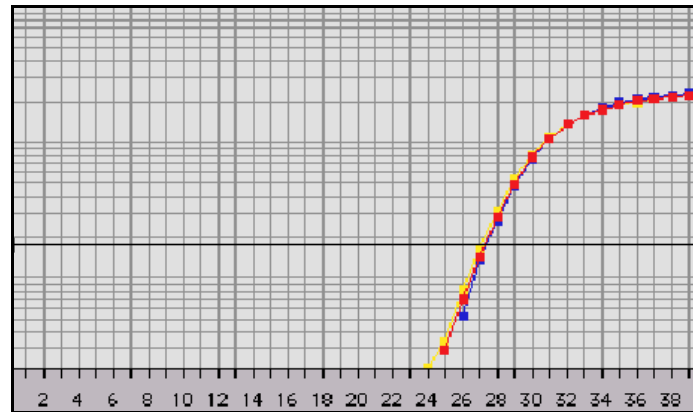


Abbildung 14: Beispielgraphen der PBGD-mRNA-Expression im Shuntmodell (• Kontrolle, • kleiner Shunt, • großer Shunt)

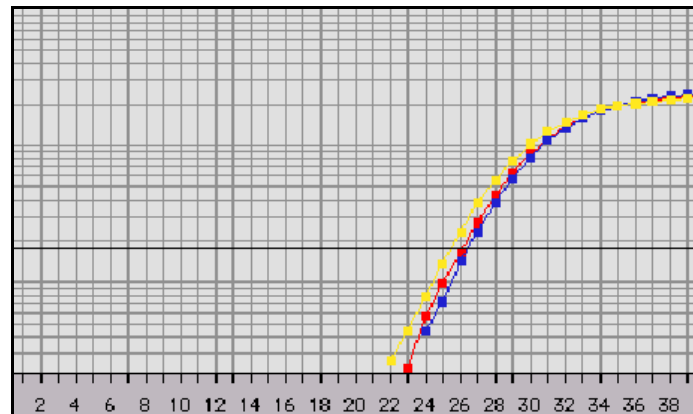


Abbildung 15: Beispielgraphen der 18SrRNA-Expression im Shuntmodell (• Kontrolle, • kleiner Shunt, • großer Shunt)

3.3 Statistische Auswertung der mRNA-Expression

Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe der *ANOVA Analyse der Varianz* und anschließender *Fischer Post-Hoc Analyse* bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Herzgewichte und hämodynamische Messungen

4.1.1 Herzgewichte der Shunt-operierten Tiere

Die Organe wurden 30 Tage nach der Shuntinduktion entnommen und gewogen (siehe Tabelle 4).

	Kontrolle	Kleiner Shunt	Großer Shunt
Relatives HGW (mg/g KG)	2.99 ± 0.06	4.52 ± 0.14**	5.92 ± 0.25**/##
Relatives RA-Gewicht (mg/g KG)	0.103 ± 0.006	0.204 ± 0.014**	0.405 ± 0.034**/##
Relatives LA-Gewicht (mg/g KG)	0.093 ± 0.007	0.176 ± 0.016**	0.235 ± 0.009**/##
Relatives RV-Gewicht (mg/g KG)	0.493 ± 0.017	0.759 ± 0.035**	1.131 ± 0.091**/##
Relatives LV-Gewicht (mg/g KG)	1.530 ± 0.065	2.263 ± 0.085**	2.808 ± 0.121**/##

Tabelle 4: Herzgewichte von Kontrolltieren und Tieren mit kleinem und großem Shunt (KG = Körpergewicht, HG = Herzgewicht, RA = rechtsatriales Gewicht, LA = linksatriales Gewicht, RV = rechtsventrikuläres Gewicht, LV = linksventrikuläres Gewicht. ** p<0,01 vs. Kontrolle; ## p<0,01 vs. kleiner Shunt)

Bei Tieren mit kleinem Shunt waren die relativen Herzgewichte und die Gewichte aller vier Herzkammern im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höher. Tiere mit großem Shunt zeigten sowohl gegenüber der Kontrollgruppe, als auch gegenüber der Gruppe mit kleinem Shunt eine deutliche Zunahme der relativen Herzgewichte und der relativen Gewichte aller Herzkammern.

4.1.2 Hämodynamische Parameter der Shunt-operierten Tiere

Zur hämodynamischen Charakterisierung des kleinen und großen aortokavalen Shunts der Ratte als experimentelles Modell der kardialen Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz unterschiedlichen Schweregrades wurde 30 Tage nach Induktion des Shunts mittlerer arterieller Druck, Herzfrequenz, zentraler Venendruck, linksventrikulärer enddiastolischer Druck und linksventrikuläre Kontraktilität bei Kontrolltieren sowie Tieren mit kleinem und großem Shunt gemessen und verglichen (siehe Tabelle 5).

	Kontrolle	Kleiner Shunt	Großer Shunt
MAD (mmHg)	92.08 ± 1.06	72.78 ± 2.13**	60.25 ± 2.67**/##
Herzfrequenz (min ⁻¹)	433.3 ± 9.3	454.1 ± 9.2	394.5 ± 16.6*/##
ZVD (mmHg)	1.60 ± 0.41	5.75 ± 0.79**	6.07 ± 0.49**
LVEDP (mmHg)	7.96 ± 1.06	13.39 ± 1.85*	16.25 ± 1.36**
dP/dt_{max} (mmHg/s)	4818 ± 186	4166 ± 259	3737 ± 254**

Tabelle 5: Hämodynamische Parameter bei Kontrolltieren und Tieren mit kleinem und großem Shunt (MAP = mittlerer arterieller Druck, HF = Herzfrequenz, ZVD = zentraler Venendruck, LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck, dP/dt_{max} = linksventrikuläre Kontraktilität. * p<0,05, ** p<0,01 vs. Kontrolle; # p<0,05, ## p<0,01 vs. kleiner Shunt)

Tiere mit kleinem Shunt hatten niedrigere mittlere arterielle Drücke als Kontrolltiere. Bei Tieren mit großem Shunt war der mittlere arterielle Druck sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch den Tieren mit kleinem Shunt erniedrigt. Tiere mit großem Shunt hatten eine niedrigere Herzfrequenz als Kontrolltiere und Tieren mit kleinem Shunt. Der zentrale Venendruck nahm bei Tieren mit kleinem Shunt und großem Shunt im Vergleich zur Kontrollgruppe zu. Erhöhte linksventrikuläre enddiastolische Drücke (LVEDP) und eine verminderte linksventrikuläre Kontraktilität als Zeichen einer Herzinsuffizienz zeigten Tiere mit großem Shunt gegenüber Kontrolltieren. Tiere mit kleinem Shunt hatten zwar einen höheren LVEDP als Kontrolltiere, die Kontraktilität war allerdings nicht erniedrigt.

4.1.3 Herzgewichte der Infarkttiere

Die Organe wurden 30 Tage nach Ligation der LAD entnommen und gewogen (siehe Tabelle 6).

	Kontrolle	Infarkt
Relatives HGW (mg/g KG)	2.60 ± 0.05	3.41 ± 0.19**
Relatives RA-Gewicht (mg/g KG)	0.104 ± 0.004	0.178 ± 0.021**
Relatives LA-Gewicht (mg/g KG)	0.070 ± 0.003	0.178 ± 0.030**
Relatives RV-Gewicht (mg/g KG)	0.474 ± 0.010	0.745 ± 0.091**
Relatives LV-Gewicht (mg/g KG)	1.249 ± 0.030	1.298 ± 0.046

Tabelle 6: Herzgewichte von Kontrolltieren und Tieren mit Infarkt (KG = Körpergewicht, HG = Herzgewicht, RA = rechtsatriales Gewicht, LA = linksatriales Gewicht, RV = rechtsventrikuläres Gewicht, LV = linksventrikuläres Gewicht.** <0,01 vs. Kontrolle)

Das relative Herzgewicht der Infarkttiere war gegenüber Kontrolltieren erhöht. Dabei kam es im Einzelnen zu einer Zunahme der relativen Gewichte beider Vorhöfe und des rechten Ventrikels. Das relative Gewicht des linken Ventrikels blieb dagegen unverändert.

4.1.4 Hämodynamische Parameter der Infarkttiere

Zur hämodynamischen Charakterisierung des Infarkts als ein weiteres experimentelles Modell der Herzinsuffizienz wurden mittlerer arterieller Druck, Herzfrequenz, zentraler Venendruck, linksventrikulärer enddiastolischer Druck und linksventrikuläre Kontraktilität zwischen Kontrolltieren und Tieren mit Ligation der LAD gemessen (siehe Tabelle 7).

	Kontrolle	Infarkt
MAD (mmHg)	85.23 ± 3.67	86.40 ± 2.13
Herzfrequenz (min ⁻¹)	431.6 ± 9.76	460.6 ± 7.0*
ZVD (mmHg)	0.04 ± 0.33	0.69 ± 0.38
LVEDP (mmHg)	19.58 ± 1.21	26.79 ± 1.39**
dP/dt_{max} (mmHg/s)	6000 ± 426	5135 ± 284

Tabelle 7: Hämodynamische Parameter bei Kontrolltieren und Tieren mit Infarkt (MAP = mittlerer arterieller Druck, HF = Herzfrequenz, ZVD = zentraler Venendruck, LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck, dP/dt_{max} = linksventrikuläre Kontraktilität. * p<0,05 vs. Kontrolle, ** p<0,01 vs. Kontrolle)

Der mittlere arterielle Druck blieb bei Infarkttieren gegenüber Kontrolltieren unverändert. Infarkttiere hatten im Vergleich zu Kontrolltieren eine höhere Herzfrequenz. Der zentrale Venendruck blieb unverändert. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck der Infarkttiere war gegenüber Kontrolltieren erhöht, die linksventrikuläre Kontraktilität tendenziell erniedrigt (p=0,09).

4.1.5 Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde planimetrisch 30 Tage nach der Operation bestimmt. Hierzu wurden linker Ventrikel und Infarktnarbe auf Millimeterpapier übertragen und die Flächen bestimmt. Die mittlere Infarktgröße betrug 35,3±3,4% des linken Ventrikels.

4.2 Linksventrikuläre mRNA-Expression des Hypertrophiemarkers ANP in den verschiedenen Tiermodellen

4.2.1 ANP-mRNA-Expression im kleinen und großen Shunt

Die linksventrikuläre mRNA-Expression von ANP, als Marker für Hypertrophie und Herzinsuffizienz, war in Tieren mit kleinem und großem Shunt im Vergleich zu Sham-operierten Tieren signifikant erhöht. Die mit dem RPA gemessenen Werte betrugen: Kontrolle $100,0 \pm 7,0\%$, kleiner Shunt $150,4 \pm 11,5\%$ der Kontrolle ($p < 0,01$ vs. Kontrolle), großer Shunt $157,9 \pm 10,4\%$ der Kontrolle ($p < 0,01$ vs. Kontrolle). Die TaqManTM-PCR ergab ein vergleichbares Expressionsprofil: Kontrolle $100,0 \pm 22,4\%$; kleiner Shunt $349,1 \pm 61,8\%$ der Kontrolle ($p < 0,01$ vs. Kontrolle), großer Shunt $4341,8 \pm 525,1\%$ der Kontrolle ($p < 0,01$ vs. Kontrolle und kleiner Shunt; siehe Abbildung 16).

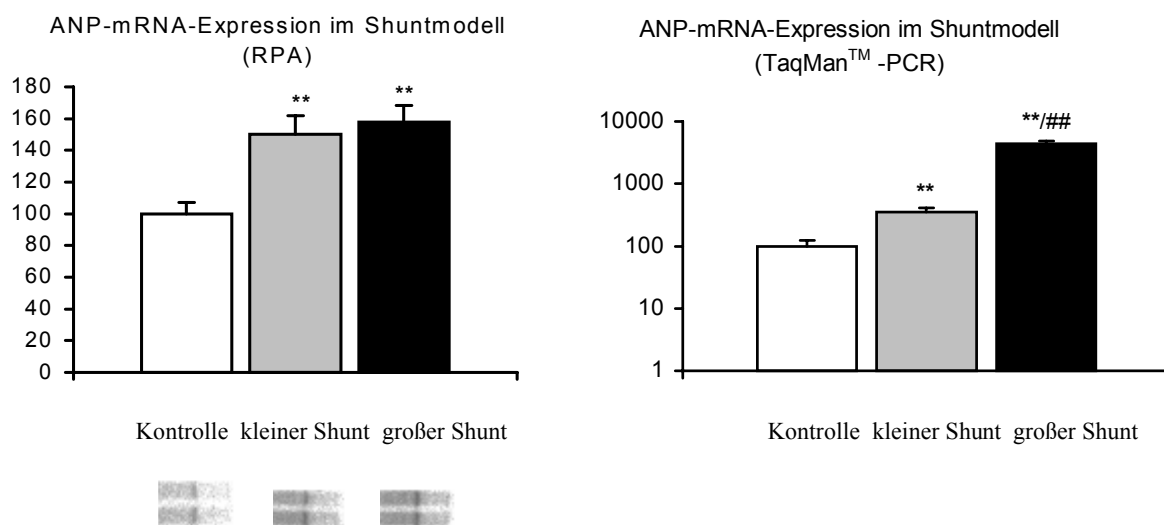


Abbildung 16: Linksventrikuläre ANP-mRNA-Expression in Tieren mit kleinem und großem Shunt (** $p < 0,01$ vs. Kontrolle, ## $p < 0,01$ vs. kleiner Shunt)

4.2.2 ANP-mRNA-Expression beim Infarkt

Wie im kleinen und großen Shunt kam es auch bei Infarkttieren zu einer signifikanten Zunahme der linksventrikulären ANP-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mit dem RPA gemessenen Werte betrugen: Kontrolle $100,0 \pm 4,6\%$, Infarkt $141,6 \pm 6,0\%$ der Kontrolle ($p < 0,01$ vs. Kontrolle).

Die TaqManTM-PCR ergab: Kontrolle $100,0 \pm 16,0\%$, Infarkt $674,1 \pm 95,2\%$ der Kontrolle; $p < 0,01$ vs. Kontrolle; siehe Abbildung 17).

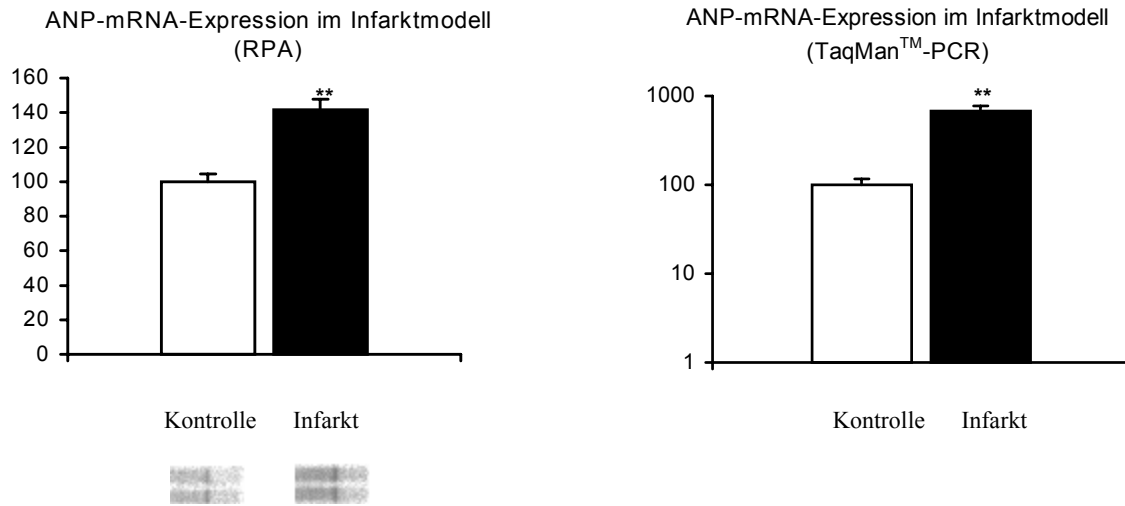


Abbildung 17: Linksventrikuläre ANP-mRNA-Expression im Infarktmodell (** $p < 0,01$ vs. Kontrolle)

4.3 Linksventrikuläre mRNA-Expression der Housekeeping-Gene in den verschiedenen Tiermodellen

4.3.1 GAPDH-mRNA-Expression im kleinen und großen Shunt

Sowohl RPA als auch TaqManTM-PCR zeigten keine signifikanten Unterschiede in der linksventrikulären GAPDH-mRNA-Expression von Tieren mit kleinem und großem Shunt im Vergleich zur Kontrollgruppe (RPA: Kontrolle $100,0 \pm 7,6\%$, kleiner Shunt $105,1 \pm 7,4\%$ der Kontrolle, großer Shunt $105,2 \pm 6,8\%$ der Kontrolle; TaqManTM-PCR: Kontrolle $100,0 \pm 3,9\%$, kleiner Shunt $114,5 \pm 18,7\%$ der Kontrolle, großer Shunt $133,6 \pm 19,1\%$ der Kontrolle; siehe Abbildung 18).

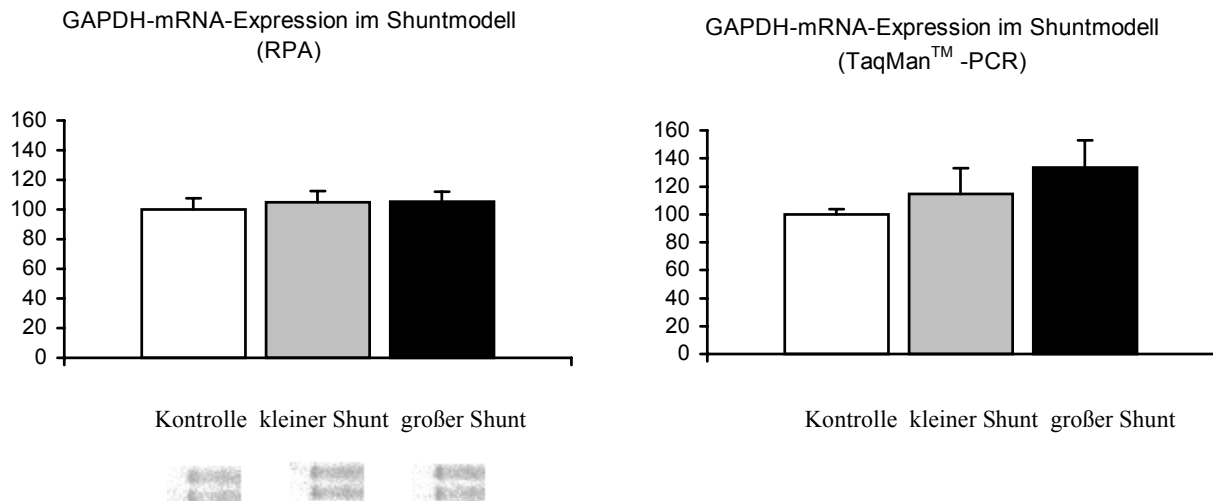


Abbildung 18: Linksventrikuläre GAPDH-mRNA-Expression in Tieren mit kleinem und großem Shunt

4.3.2 GAPDH-mRNA-Expression beim Infarkt

Im RPA zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe unveränderte linksventrikuläre GAPDH-mRNA-Expression der Infarkttiere (Kontrolle 100,0±4,3%, Infarkt 88,4±3,7% der Kontrolle), wogegen sich bei der TaqManTM-PCR signifikant erniedrigte Werte für die GAPDH-mRNA-Expression in der Infarkttiere ergaben (Kontrolle 100,0±9,1%, Infarkt 64,2±6,2% der Kontrolle; $p < 0,01$ vs. Kontrolle; siehe Abbildung 19).

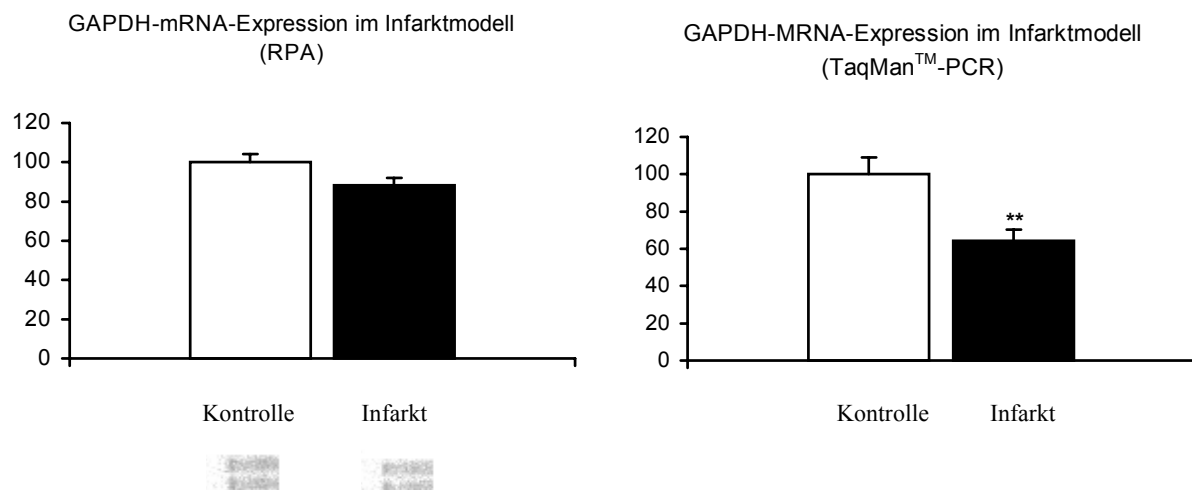


Abbildung 19: Linksventrikuläre GAPDH-mRNA-Expression im Infarktmodell (** $p < 0,01$ vs. Kontrolle)

4.3.3 Cyclophilin-mRNA-Expression im kleinen und großen Shunt

Im RPA zeigte sich in der Gruppe des kleinen und des großen Shunt eine unveränderte linksventrikuläre Expression der Cyclophilin-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle $100,0 \pm 7,9\%$, kleiner Shunt $96,4 \pm 11,5\%$ der Kontrolle, großer Shunt $112,9 \pm 4,9\%$ der Kontrolle). Bei der TaqManTM-PCR wurden dagegen signifikant erhöhte Expressionswerte bei Tieren mit großen Shunt im Vergleich zu Kontrolltieren gemessen (Kontrolle $100,0 \pm 7,6\%$, kleiner Shunt $110,7 \pm 8,0\%$ der Kontrolle, großer Shunt $166,8 \pm 19,29\%$ der Kontrolle; $p < 0,01$ vs. Kontrolle; siehe Abbildung 20).

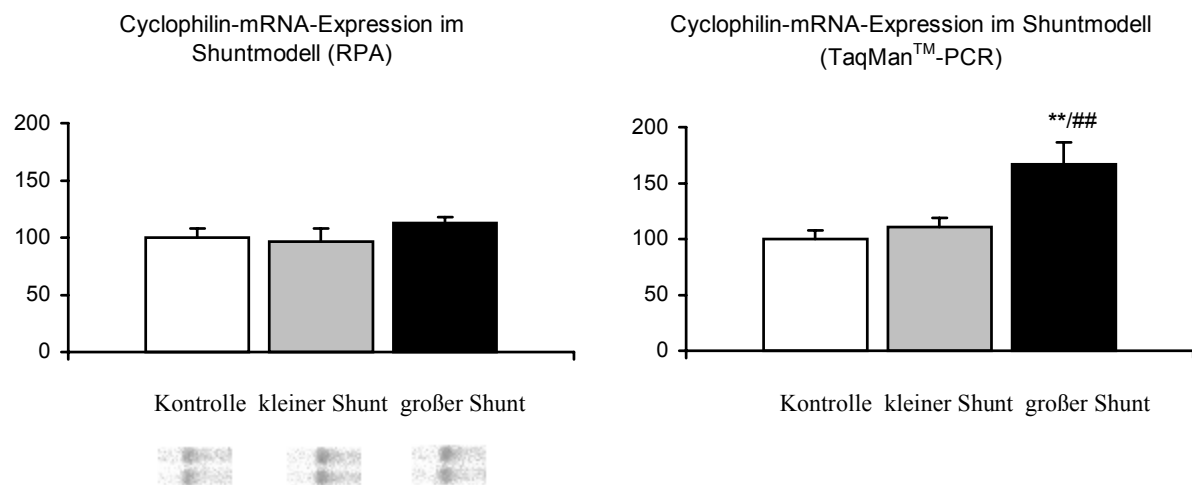


Abbildung 20: Linksventrikuläre Cyclophilin-mRNA-Expression in Tieren mit kleinem und großem Shunt (** $p < 0,01$ vs. Kontrolle, ## $p < 0,01$ vs. kleiner Shunt)

4.3.4 Cyclophilin-mRNA-Expression beim Infarkt

Die linksventrikuläre Cyclophilin-mRNA-Expression in der Infarktgruppe war unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe (RPA: Kontrolle $100,0 \pm 10,5\%$, Infarkt $95,7 \pm 13,8\%$ der Kontrolle; TaqManTM-PCR: Kontrolle $100,0 \pm 14,3\%$, Infarkt $80,0 \pm 9,4\%$ der Kontrolle; siehe Abbildung 21).

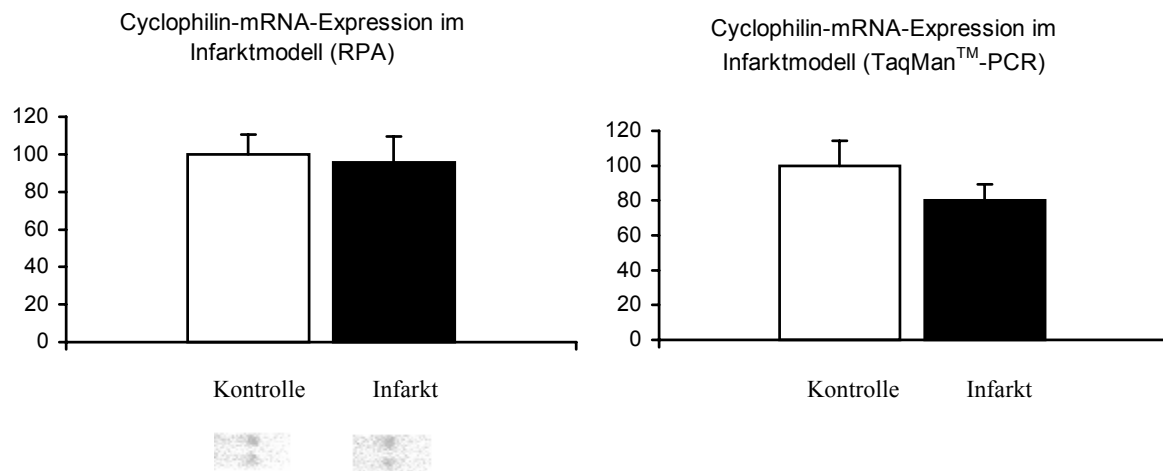


Abbildung 21: Linksentrikuläre Cyclophilin-mRNA-Expression im Infarktmodell

4.3.5 PBGD-mRNA-Expression im kleinen und großen Shunt

Sowohl RPA als auch TaqManTM-PCR zeigten keinen signifikanten Unterschied in der linksventrikulären PBGD-mRNA-Expression beider Shuntgruppen im Vergleich zur Kontrolle (RPA: Kontrolle 100,0 ± 8,6%, kleiner Shunt 81,9 ± 6,3% der Kontrolle, großer Shunt 83,7 ± 4,7% der Kontrolle; TaqManTM-PCR: Kontrolle 100,0 ± 5,6%, kleiner Shunt 109,2 ± 14,4% der Kontrolle, großer Shunt 116,8 ± 7,1% der Kontrolle; siehe Abbildung 22).

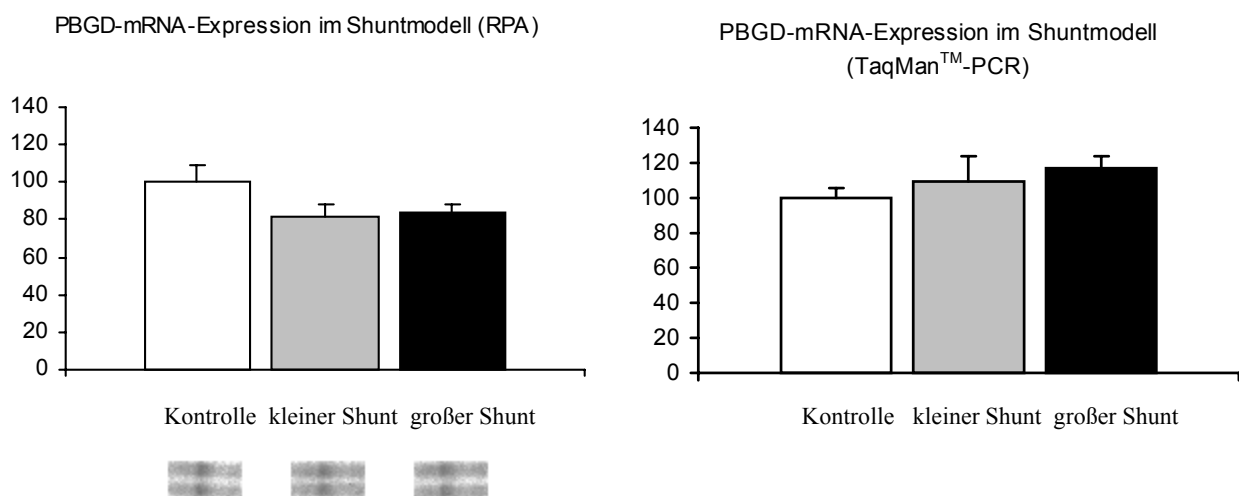


Abbildung 22: Linksentrikuläre PBGD-mRNA-Expression in Tieren mit kleinem und großem Shunt

4.3.6 PBGD-mRNA-Expression beim Infarkt

Beim RPA war die linksventrikuläre PBGD-mRNA-Expression der Infarkttiere unverändert gegenüber Kontrolltieren (Kontrolle $100,0 \pm 9,7\%$, Infarkt $79,8 \pm 9,7\%$ der Kontrolle). Dagegen ergab die TaqManTM-PCR eine signifikant erniedrigte PBGD-mRNA-Expression in Infarkttieren im Vergleich zu Kontrolltieren (Kontrolle $100,0 \pm 5,9\%$, Infarkt $62,8 \pm 6,3\%$ der Kontrolle; $p < 0,01$ vs. Kontrolle; siehe Abbildung 23).

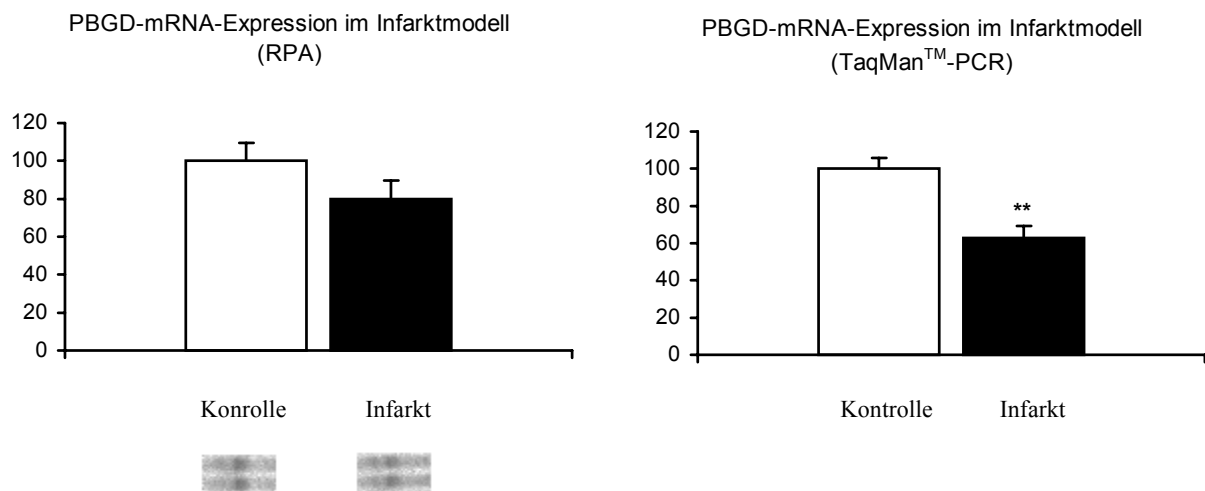


Abbildung 23: Linksventrikuläre PBGD-mRNA-Expression im Infarktmodell (** $p < 0,01$ vs. Kontrolle)

4.3.7 18SrRNA-Expression im kleinen und großen Shunt

RPA und TaqManTM-PCR ergaben keinen Unterschied in der linksventrikulären 18SrRNA-Expression im kleinen und großen Shunt verglichen mit Kontrolltieren (RPA: Kontrolle $100,0 \pm 4,8\%$, kleiner Shunt $110,7 \pm 8,2\%$ der Kontrolle, großer Shunt $104,4 \pm 8,9\%$ der Kontrolle; TaqManTM-PCR: Kontrolle $100,0 \pm 17,7\%$, kleiner Shunt $100,5 \pm 18,1\%$ der Kontrolle, großer Shunt $109,7 \pm 15,8\%$ der Kontrolle; siehe Abbildung 24).

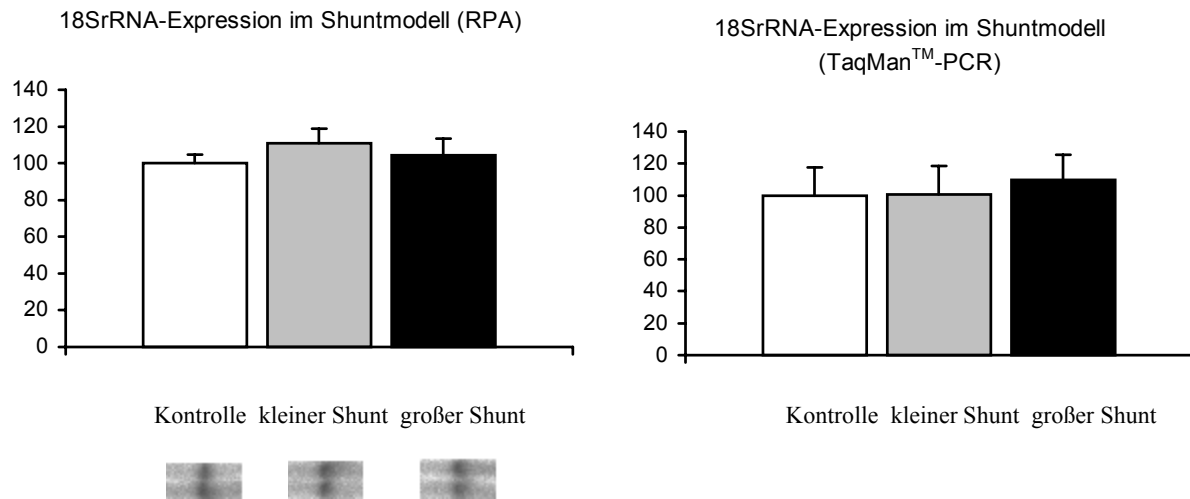


Abbildung 24: Linksventrikuläre 18SrRNA-Expression in Tieren mit kleinem und großem Shunt

4.3.8 18SrRNA-Expression beim Infarkt

Auch Infarkttiere zeigten weder beim RPA noch in der TaqManTM-PCR signifikante Unterschiede in der linksventrikulären 18SrRNA-Expression der Infarkttiere gegenüber Kontrolltieren (RPA: Kontrolle 100,0±13,1%, Infarkt 107,5±12,0% der Kontrolle; TaqManTM-PCR: Kontrolle 100,0±6,4%, Infarkt 122,7±13,0% der Kontrolle; siehe Abbildung 25).

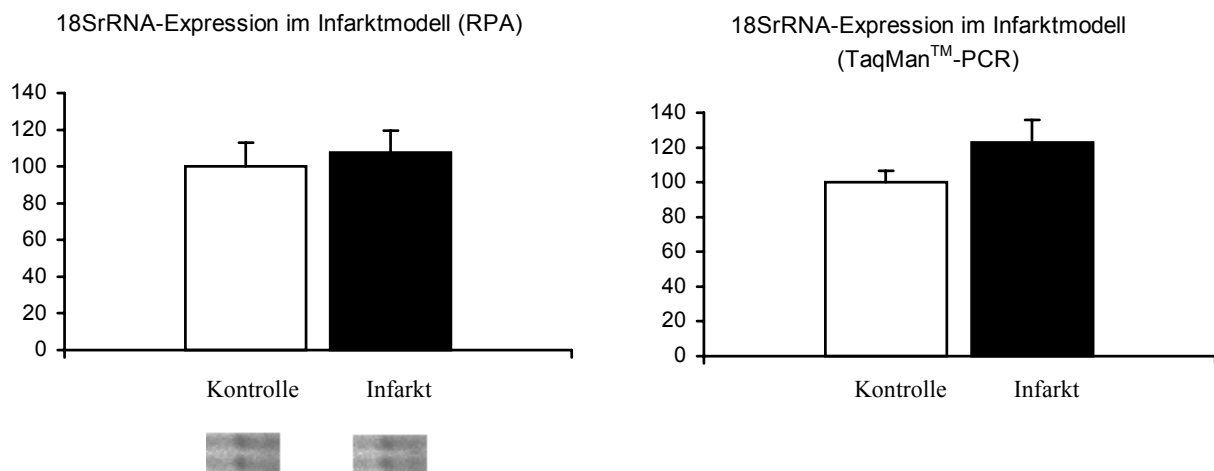


Abbildung 25: Linksventrikuläre 18SrRNA-Expression im Infarktmodell

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen geeigneten internen Standard zur RNA-Quantifizierung bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz in der Ratte zu finden. Hierzu wurde die linksventrikuläre mRNA-Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Cyclophilin, Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) sowie 18SrRNA in Tieren mit kleinem und großem Shunt sowie Myokardinfarkt, als verschiedene Modelle der experimentellen Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz, bestimmt. Die Tiere wurden hämodynamisch charakterisiert und die linksventrikuläre mRNA-Expression der Housekeeping-Gene mit Hilfe von Ribonuklease-Protektion-Assay und TaqManTM-PCR untersucht. Beide Methoden sind häufig verwendete Verfahren zur Quantifizierung von mRNA, wobei sich die TaqManTM-PCR durch ihre höhere Sensitivität und Spezifität auszeichnet^{119;120}. Die Anwendung von zwei unterschiedlichen Methoden ermöglichte einerseits die Kontrolle der Ergebnisse, andererseits konnte der Einfluss der Detektionsmethode auf die Expressionswerte gezeigt werden. Die linksventrikuläre ANP-mRNA-Expression als bekannter Hypertrophie- und Insuffizienzmarker diene in allen Untersuchungen als Positivkontrolle.

5.1 Der aortokavale Shunt und der Myokardinfarkt als Hypertrophie- bzw. Herzinsuffizienzmodell

Hypertrophie und Herzinsuffizienz können durch eine Vielzahl kardialer und extrakardialer Störungen verursacht oder begünstigt werden. Mögliche Ursachen sind eine verminderte O₂-Versorgung durch Koronare Herzerkrankung oder Myokardinfarkt, eine Druckbelastung bei erhöhtem Blutdruck oder eine Volumenbelastung. Aufgrund der Heterogenität der Ursachen von Hypertrophie und Herzinsuffizienz wurden die Daten an unterschiedlichen Tiermodellen erhoben.

Als Herzinsuffizienzmodell, verursacht durch eine chronische Volumenbelastung, wurde der infrarenale aortokavale Shunt der Ratte gewählt. Die Auswahl unterschiedlicher Shuntgrößen (kleiner und großer Shunt) ermöglichte die Erzeugung von Hypertrophie und Herzinsuffizienz im gleichen Tiermodell.

Durch hämodynamische Messungen und die Bestimmung der Organgewichte wurden die Tiermodelle charakterisiert. Als Parameter einer bestehenden Herzinsuffizienz wurden der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und die linksventrikuläre Kontraktilität (dp/dt_{\max}) bestimmt.

Tiere mit kleinem Shunt zeigten einen mäßigen Anstieg des zentralen Venendruckes (ZVD) und des LVEDP. Die Kontraktilität war nicht eingeschränkt. Die Zunahme sowohl des Gesamtherzgewichts als auch des Gewichtes der einzelnen Herzkammern kennzeichnete die kardiale Hypertrophie.

Tiere mit großem Shunt hatten im Vergleich zu Tieren mit kleinem Shunt höhere Herzgewichte. Die kardiale Hypertrophie beim großen Shunt war deutlich ausgeprägter als im kleinen Shunt. Auch hämodynamisch unterschieden sich beide Herzinsuffizienzmodelle voneinander. Sowohl der LVEDP als auch der ZVD waren im großen Shunt signifikant erhöht. Die Kontraktilität, als typisches Merkmal der Herzinsuffizienz, war dagegen beim großen Shunt signifikant um etwa 25 % vermindert.

Als weiteres Tiermodell der Herzinsuffizienz diente der durch Ligation der LAD erzeugte Myokardinfarkt. Auch in diesem Modell kam es zu einer kardialen Hypertrophie, gekennzeichnet durch eine Zunahme des Gesamtgewichts und des Gewichtes der einzelnen Herzkammern. Eine Ausnahme bildete dabei der linke Ventrikel, dessen Gewicht konstant blieb. Vermutlich reagierten auch die noch vitalen linksventrikulären Myokardzellen mit Hypertrophie. Aufgrund des ausgeprägten Infarkts blieb jedoch eine Zunahme des Gesamtgewichts aus. Die linksventrikuläre Kontraktilität war zwar im Vergleich zur Kontrolle um 15% erniedrigt, jedoch nicht signifikant. Der LVEDP als Merkmal einer Herzinsuffizienz war deutlich erhöht.

Die Gewichtsbestimmung und die hämodynamischen Messungen zeigten, dass die verwendeten Tiere als Modelle für kardiale Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz geeignet waren. Ob die Daten uneingeschränkt auf andere Tiermodelle oder die entsprechende Erkrankung beim Menschen übertragbar sind, bleibt jedoch unklar.

5.2 Die linksventrikuläre ANP-mRNA-Expression

ANP wird kardial synthetisiert und in den Kreislauf freigesetzt. Hauptwirkungen von ANP sind Natriurese, Diurese, sowie Vasodilatation. ANP wird bei der Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert¹²¹⁻¹²⁵. Es ist ein Hypertrophiemarker^{111;126} und korreliert relativ gut mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz¹²⁷⁻¹²⁹. Daher ist ANP-mRNA eine geeignete Positivkontrolle in den verwendeten Tiermodellen.

Die linksventrikuläre ANP-mRNA-Expression war in allen Hypertrophie- und Herzinsuffizienzmodellen im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht. Dabei unterschied sich das Ausmaß des Anstiegs in den einzelnen Gruppen erheblich in Abhängigkeit von der verwendeten Detektionsmethode. Während mit dem Ribonuklease Protektion Assay (RPA) lediglich ein ca. 50%iger Anstieg der ANP-mRNA-Expression bei Tieren mit kleinem und großem Shunt sowie Infarkttieren im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in der TaqManTM-PCR ein ca. 3,5facher Anstieg in Tieren mit kleinem Shunt, ein ca. 6,5facher Anstieg in Infarkttieren und ein 43facher Anstieg der ANP-mRNA-Expression in Tieren mit großem Shunt im Vergleich zu Kontrolltieren.

Auch früher erhobene Daten zeigten eine erhöhte ANP-mRNA-Expression bei Tieren mit kleinem und großem Shunt im Vergleich zu Kontrolltieren. Mit Hilfe von Northern Blot bzw. Slot Blot wurde ein bis zu 5facher Anstieg der ANP-Expression gemessen⁹⁰.

Ursache für diese unterschiedlich erzielten Expressionswerte könnte der geringe dynamische Messbereich des RPAs sein, bei dem die Genexpression anhand der optischen Dichte bestimmt wird. Befinden sich die Expressionswerte an der oberen messbaren Dichte, können Unterschiede nicht mehr detektiert werden. Dagegen ist die TaqManTM-PCR wesentlich sensitiver und erlaubt die genaue Expressionsbestimmung über einen großen Messbereich (siehe auch 5.4). Eine weitere Erklärung wäre, dass die Konzentration der ANP-Sonden für das RPA nicht ausreichend war. Da alle Sonden jedoch vor der Anwendung getestet und die optimale Konzentration bestimmt wurde, kann dies als Ursache ausgeschlossen werden.

5.3 Die linksventrikuläre mRNA-Expression der Housekeeping-Gene

5.3.1 GAPDH

GAPDH ist ein wichtiges Enzym der Glykolyse und ein klassisches Housekeeping-Gen. Erst in den letzten Jahren zeigte sich, dass GAPDH nicht nur ein Enzym des Glucosestoffwechsels ist, sondern eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen erfüllt^{54;55}. GAPDH wird sehr häufig als interner Standard verwendet, da bisher eine von externen Faktoren unabhängige Expression angenommen wurde. Mittlerweile gibt es jedoch eine Reihe von Veröffentlichungen, die eine Regulation von GAPDH, z.B. unter Hypoxie, bei Zellproliferation und bei Zelldifferenzierung zeigen. Deshalb ist es erforderlich, die Eignung von GAPDH als interner Standard für die jeweils verwendete Methode zu testen.

Kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz führen zu charakteristischen Änderungen in der Genexpression. Es werden eine Reihe von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, wie insulin-like growth factor (IGF), transforming growth factor (TGF) und platelet-derived growth factor (PDGF) freigesetzt⁸⁷. Myokardinfarkt und Hypertrophie bedeuten für die Myokardzellen hypoxischen Stress. Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen keine Daten über die Regulation von GAPDH bei kardialer Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz vor. Die vorliegende Studie untersucht daher die linksventrikuläre GAPDH-mRNA-Expression an verschiedenen Tiermodellen der Herzhypertrophie bzw. Herzinsuffizienz.

Der RPA ergab keine signifikanten Veränderungen der GAPDH-mRNA-Expression im Shunt- bzw. Infarktmodell im Vergleich zu Kontrolltieren. In der TaqManTM-PCR war die mRNA-Expression von GAPDH im kleinen und großen Shunt, verglichen mit der Kontrollgruppe, eher erhöht, es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Dagegen war in der Gruppe der Infarkttiere die mit der TaqManTM-PCR gemessene GAPDH-mRNA-Expression gegenüber Kontrolltieren signifikant erniedrigt. Daraus ergibt sich, dass GAPDH kein geeigneter interner Standard bei der kardialen mRNA-Analyse ist, insbesondere bei der Verwendung äußerst sensitiver Methoden wie TaqManTM-PCR.

Unterschiedliche Veröffentlichungen zeigen eine Regulation von GAPDH z.B. unter dem Einfluss von Hypoxie. Untersuchungen an verschiedenen Prostatakarzinom- bzw. Endothelzelllinien unter O₂-Mangel ergab eine höhere Expression von GAPDH. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible-factor 1 (HIF-1) die Transkription von GAPDH und anderen Enzymen der Glykolyse induziert.

HIF-1 wird auch durch sauerstoffunabhängige Faktoren aktiviert. Hierzu gehören verschiedene Onkoproteine, Insulin, insulin-like growth factor 1 und 2 (IGF 1, IGF 2) und Interferon. Sie wirken mittels liganden-spezifischer Tyrosinkinaserzeptoren⁴⁷. Bei Entzündungsreaktionen kommt es zur Freisetzung von Zytokinen. Diese bewirken durch Induktion der NO-Synthetase eine vermehrte Freisetzung des zytotoxisch wirkenden NO. Dieses hemmt die mitochondriale Elektronentransportkette und die Aktivität von GAPDH. NO verstärkt die Auto-ADP-Ribosylation von GAPDH. Die ADP-Ribosylation findet vermutlich an einem hochkonservierten Cystein im Bereich der NAD-Bindungsstelle statt und verursacht die Inaktivierung des Enzyms⁵⁷. Gleichzeitig bewirkt NO aber auch eine erhöhte Expression von GAPDH. Ursache hierfür könnten verschiedene Anpassungsmechanismen der Zelle an eine verminderte Energieproduktion und hypoxischen Stress sein⁵⁹. Hypoxieintolerante Zellen wie z.B. renale Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Lungenfibroblasten reagieren nicht mit einer Erhöhung der GAPDH-mRNA-Expression. Man vermutet, dass die Induktion von GAPDH kein allgemein gültiger Adaptionsmechanismus, sondern vielmehr kennzeichnend für hypoxietolerante Zellen ist⁵⁰.

Für die Messung der GAPDH-Expression beim Infarktmodell wurde lediglich das vitale Gewebe des linken Ventrikels verwendet. Möglicherweise wäre eine erhöhte Expression von GAPDH im ischämischen Bereich um die Infarktnarbe nachweisbar. Veränderungen in der Genexpression in dieser Region lassen sich jedoch aufgrund des kleinen Anteils bei Untersuchungen am linken Ventrikel kaum nachweisen.

Eine Reihe von Veröffentlichungen beschäftigen sich mit der GAPDH-mRNA-Expression in malignen Zellen und in Tumoren. Es wurde gezeigt, dass es durch die Induktion der hepatozellulärer Proliferation mittels Tetrachloriden nahezu zur Verdopplung der Expression von GAPDH-mRNA kommt⁵¹. In humanen hepatozellulären Karzinomzellen ist im Vergleich zu gesunden Leberzellen die GAPDH-Expression sogar bis auf das 16fache erhöht. Auch in verschiedenen anderen Tumorzellen (Mammakarzinom, Lungentumor, Pankreaskarzinom, Nierenkarzinom) konnte eine vermehrte Expression von GAPDH nachgewiesen werden^{58;130-132}. Vermutlich steht die erhöhte Expression von GAPDH in Tumorzellen im Zusammenhang mit dem erhöhten Stoffwechselumsatz der Zelle und der Freisetzung von HIF-1-aktivierenden Onkoproteinen.

Eine gesteigerte GAPDH-mRNA-Expression findet man nicht nur in malignen Zellen, sondern auch bei akuter Pankreatitis¹³³.

Im Gegensatz dazu führt Nahrungsentzug in Zellen des oberen Intestinaltrakts und des Pankreas zu einer verminderten Expression von GAPDH⁶⁰. In kultivierten Fibroblasten ist die GAPDH-mRNA-Expression gegenüber normalen Hautzellen auf das 2-6fache erhöht⁷⁰. Die GAPDH-Expression erhöht sich während der Epithelzelldifferenzierung von Keratinozyten, die mit HPV (Humanes Papillomavirus) infiziert sind, auf das 4,9fache¹³⁵.

GAPDH gehört zu den am häufigsten verwendeten internen Standardgenen bei der Quantifizierung von mRNA. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass GAPDH nicht nur ein Enzym der Glukolyse ist, sondern vielfältige Funktionen in der Zelle erfüllt. Dies erklärt die in vielen Untersuchungen nachgewiesene Variabilität der Expression des klassischen Housekeeping-Gens. Möglicherweise erklären sich durch die Multifunktionalität des Enzyms scheinbar widersprüchliche Beobachtungen. Dabei könnten unterschiedliche Regulationsmechanismen *in vivo* und *in vitro* sowie verschiedene Kontrollmechanismen der Promotoraktivität unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen eine Rolle spielen. Wie diese Arbeit und andere Untersuchungen zeigen, sollte eine Regulation der GAPDH-Expression unter den spezifischen experimentellen Bedingungen vor der Anwendung als interner Standard ausgeschlossen werden.

5.3.2 Cyclophilin

Das zu der Gruppe der Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen gehörende Cyclophilin bindet das immunsuppressiv wirkende Cyclosporin A und hemmt dessen Aktivität. Es gehört zur Gruppe der Housekeeping-Gene und wurde in den letzten Jahren immer häufiger als Standardgen zur RNA-Normalisierung verwendet⁶²⁻⁶⁴.

Die Untersuchung der Cyclophilin-mRNA-Expression mit dem RPA ergab keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Tiermodellen verglichen mit Kontrolltieren. In der Gruppe der Infarkttiere war die mit TaqManTM-PCR gemessene Cyclophilin-mRNA-Expression eher erniedrigt, jedoch nicht signifikant. Dagegen zeigte die TaqManTM-PCR in Tieren mit großem Shunt eine deutliche Erhöhung der Cyclophilin-mRNA im Vergleich zu Kontrolltieren. Cyclophilin ist daher, ebenso wie GAPDH, als interner Standard bei der kardialen mRNA-Analyse, insbesondere bei der Verwendung äußerst sensibler Methoden, ungeeignet.

Eine ähnliche Studie untersuchte das Verhältnis der linksventrikulären Expression von GAPDH und Cyclophilin an hypertensiven Ratten.

Mit Hilfe von Northern-Blots wurde die mRNA-Expression der Housekeeping-Gene in 6 Monate alten hypertensiven, mit Enalapril (ACE-Hemmer) behandelten und normotonen Ratten bestimmt. Trotz unterschiedlicher hämodynamischer Eigenschaften der untersuchten Gruppen war das Verhältnis von Cyclophilin- und GAPDH-mRNA-Expression gleich. Hieraus wurde auf eine unveränderte Expression von GAPDH und Cyclophilin bei hypertensiven bzw. mit ACE-Hemmern behandelten Ratten geschlossen ¹³⁶. Eine gleichzeitige Induktion bzw. Suppression von GAPDH und Cyclophilin würde jedoch Unterschiede in der Expression beider Gene verbergen. Das Verhältnis von GAPDH und Cyclophilin, bezogen auf in dieser Arbeit erhobenen Daten, würde ebenfalls nur geringe Veränderungen in der Expression zeigen.

Einige Untersuchungen konnten eine geringere Variabilität der Expression von Cyclophilin im Vergleich zu GAPDH nachweisen. In normalen Keratinozyten und in HPV-infizierten Keratinozyten ist die Cyclophilin-Expression im Vergleich zu GAPDH stabil ¹³⁵. Ähnliche Ergebnisse erzielten Untersuchungen an 78 verschiedenen Zelllinien und Gewebetypen, wie z.B. Cerebrum, Mamma, Kolon, Leber, Ovar, Pankreas, Prostata und Cutis. Die Cyclophilin-mRNA-Expression war im Vergleich zu GAPDH stabiler. Daher wurde hier Cyclophilin, anstelle des häufig verwendeten GAPDH, als interner Standard bei der mRNA-Quantifizierung empfohlen ⁶⁴.

Andere Untersuchungen zeigen dagegen eine Regulation von Cyclophilin bei Hypoxie und Hitzeschock. Cyclophilin wirkt bei der Faltung von Proteinen mit. Man vermutet eine funktionelle Assoziation mit spezifischen Hitzeschockproteinen. Hitzeschock und Hypoxie bewirken eine signifikante Induktion der Expression von Cyclophilin in myokardialen Zellen ⁴⁸. Die aufgrund der Hypertrophie verminderte Perfusion des Myokards könnte die mit der TaqManTM-PCR nachgewiesene signifikant erhöhte Expression von Cyclophilin in Tieren mit großem Shunt erklären. Da lediglich das linksventrikuläre vitale Gewebe der Infarkttiere untersucht wurde, können mögliche Änderungen der Genexpression im ischämischen Bereich um die Infarktnarbe nicht nachgewiesen werden.

Cyclophilin scheint auch eine Rolle bei der Entstehung von Ischämie-Reperfusion-Schäden des Myokards zu spielen. Hierbei könnte die nachgewiesene Wirkung von Cyclophilin auf kalziumabhängige Kanäle eine Rolle spielen. Die mitochondriale Isoform des Cyclophilins ist ein Bestandteil eines Kanals (PT-Pore) der inneren und äußeren mitochondrialen Membran. Man nimmt an, dass dieser Kanal bei Apoptose und Nekrose mitwirkt ^{48,65}.

Wenn verschiedene Zelllinien hypoxischen Bedingungen (1% O₂, 24 Stunden) ausgesetzt werden, bewirkt Hypoxie nicht in allen Zellen die Induktion von Cyclophilin. In Endothelzellen der Vena Umbilicalis ist die Expression um bis zu 22,8% erniedrigt, in Prostatakarzinomzellen dagegen um bis 7,5% erhöht ⁴⁷.

5.3.3 PBGD

PBGD ist ein Schlüsselenzym der Porphyrinsynthese. Es besitzt zwei Promotoren und kodiert für das erythrozyten-spezifische Isoenzym (42kDa) und das ubiquitär vorkommende Isoenzym (44kDa). Der Promotor des erythrozytenspezifischen PBGD weist strukturelle Ähnlichkeiten mit dem β -Globin-Gen auf. Der Promotor des ubiquitären Enzyms enthält eine Sp1-Bindungsstelle, die charakteristisch für viele Housekeeping-Gene ist. PBGD wird als pseudogenfreies Housekeeping-Gen von einigen Autoren als Standardgen für die mRNA-Quantifizierung empfohlen ⁶⁷. Es liegen jedoch nur wenige Veröffentlichungen vor, die die Expression des pseudogenfreien Housekeeping-Gens unter verschiedenen experimentellen Bedingungen untersucht haben.

Die vorliegende Untersuchung konnte eine unveränderte PBGD-mRNA-Expression in Tieren mit Shunt verglichen mit Kontrolltieren zeigen. Infarkttiere zeigten im RPA tendenziell (nicht signifikant) erniedrigte PBGD-mRNA-Expressionwerte im Vergleich zu Kontrolltieren. Bei der Untersuchung der Infarkttiere mit Hilfe der TaqManTM-PCR wurde eine deutlich verminderte PBGD-mRNA-Expression gegenüber Kontrolltieren nachgewiesen. Aus den vorliegenden Daten ergibt sich, dass PBGD kein zuverlässiges Kontrollgen für die kardiale mRNA-Expressionsanalyse ist.

Untersuchungen an verschiedenen Nephronabschnitten zeigten, dass das ubiquitär vorkommende PBGD nicht in allen Zellen gleich exprimiert wird. Tubulus-Homogenisate weisen wesentlich höhere PBGD-mRNA-Level auf als Glomeruli-Homogenisate ⁶⁸. Aus anderen Veröffentlichungen geht hervor, dass die PBGD-mRNA-Expression des Housekeeping-Gens in verschiedenen Zellhomogenisaten und in durch Laser spezifisch ausgewählten Zellen konstant ist ⁶⁷.

In Erythrozyten wird PBGD unter hypoxischen Bedingungen aktiviert ¹³⁷. Buttersäure induziert in humanen leukämischen multipotenten Zellen der K562-Linie die Hämoglobinisierung dosis- und zeitabhängig. Gleichzeitig kommt es zur vermehrten Expression von PBGD-mRNA ¹³⁸.

Ebenso bewirken subtoxische Konzentrationen verschiedener Antrazykline eine Differenzierung in Richtung Hämatopoese und die Stimulierung der PBGD-Expression in diesen Zellen. Neuere Untersuchungen an Gliomazellen zeigen eine starke Assoziation von PBGD und Nukleolus. In PBGD transfizierten Gliomazellen kommt es zur Differenzierung in Richtung Astrozyten. Mit Hilfe der Immunofluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Gliomazellen zur Differenzierung, eine verminderte Konzentration von PBGD sowohl im Zytoplasma als auch im Kern bewirkt. Diese Untersuchungen lassen neben der Enzymfunktion von PBGD in der Porphyrinsynthese auf eine mögliche regulative Funktion von PBGD bei Proliferation und Differenzierung in Gliomazellen schließen¹³⁹.

5.3.4 18SrRNA

Die Gesamt-RNA besteht zu 80% aus ribosomaler RNA. Daher nimmt man an, dass die Menge der ribosomalen RNA geringeren Schwankungen ausgesetzt ist. Verschiedene Autoren empfehlen die Anwendung ribosomaler RNA bei der Normalisierung von mRNA, da in verschiedenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass die rRNA-Expression im Gegensatz zu anderen Housekeeping-Genen relativ stabil ist^{46;47;62}.

Auch in den vorliegenden untersuchten Modellen konnte gezeigt werden, dass 18SrRNA ein geeignetes Standardgen für Genexpressionsanalysen bei Hypertrophie und Herzinsuffizienz ist. Im Gegensatz zu GAPDH, Cyclophilin und PBGD war es das einzige Housekeeping-Gen, bei dem auch mit der sehr sensitiven TaqManTM-PCR eine stabile Expression sowohl in Tieren mit Shunt als auch in Tieren mit Infarkt nachgewiesen werden konnte. Daher kann 18SrRNA als Kontrollgen zur kardialen mRNA-Expressionsanalyse unter den Bedingungen von kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz verwendet werden.

Auch in kultivierten Hautfibroblasten und in Zellen des Pankreas bzw. oberen Gastrointestinaltraktes bei Nahrungsentzug ist die 18SrRNA-Expression im Vergleich zu anderen Housekeeping-Genen stabil^{60;70}. Das Gleiche gilt für die 28SrRNA-Expression im hepatozellulären Karzinom und bei Hypoxie^{47;49}. Trotzdem kann ribosomale RNA nicht uneingeschränkt für die Normalisierung von mRNA empfohlen werden. Es ist bekannt, dass es in leukämischen Zellen zu Störungen im RNA-Metabolismus kommt^{71;72}. Perfetti et al. untersuchten die Expression von Housekeeping-Genen beim Morbus Hodgkin. Die Expression von GAPDH ist in chronisch entzündlichen Tonsillen bzw. im Lymphknoten eines Patienten mit B-Zell-Lymphom relativ homogen.

Dagegen variiert in den befallenen Lymphknoten die GAPDH-Expression sehr stark ¹⁴⁰. Finnegan et al. testeten die Expression häufig genutzter Housekeeping-Gene in verschiedenen Non-Hodgkin Lymphomen. Mit Hilfe des Northern Blots wurden die Expressionslevel von β -Aktin, α -Tubulin, β 2-Mikroglobulin und GAPDH im Vergleich zu ribosomaler RNA bestimmt. In reaktiv hyperplastischen Lymphknoten korreliert die Expression von 18SrRNA mit den Housekeeping-Genen. Niedrig- und hochmaligne Lymphome zeigen große Unterschiede im Verhältnis 18SrRNA und Housekeeping-Gen, wobei GAPDH als einziges Housekeeping-Gen noch relativ konstant exprimiert wurde. Sie empfehlen die Anwendung von 18S or 28S rRNA zur RNA-Quantifizierung ¹⁴¹.

Raaijmakers et al. untersuchten die Genexpressionen von 18SrRNA und GAPDH in einer kleinen Anzahl von aufgereinigten normalen und leukämischen $CD34^+CD38^-$ und $CD34^+CD38^+$ -Zellen mit Hilfe der „Real-Time“-PCR. $CD34^+CD38^-$ sind Zellen der normalen Hämatopoese mit Stammzeleigenschaften, die eine Rolle bei der Entstehung von Leukämien spielen. Die leukämischen Zellen zeigen im Vergleich zu normalen Knochenmarkzellen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von GAPDH-mRNA. Die Expression von 18SrRNA variiert dagegen stark. Insbesondere leukämische $CD38^+$ Zellen weisen signifikant niedrigere 18SrRNA-Level als normale Knochenmarkzellen auf. Diese Aussage korreliert mit anderen Veröffentlichungen, die eine Einschränkung der rRNA-Synthese bei der Akuten-Lymphatischen-Leukämie belegen ⁷³. Damit ergibt sich die Frage, ob die Variation des Verhältnisses von GAPDH zu 18SrRNA im Non-Hodgkin-Lymphom nicht durch eine unterschiedliche Expression der rRNA hervorgerufen wird. Dies unterstreicht die Bedeutung der Auswahl eines geeigneten Standards zur RNA-Quantifizierung.

Nicht nur in leukämischen Zellen kommt es zu Änderungen des rRNA-Gehalts der Zelle. Unterschiedliche äußere Bedingungen wie Hitzeschock, Nahrungsentzug und Änderungen der Wachstumsrate führen in Bakterien zu einer erheblichen Veränderung des rRNA-Gehalts. Untersuchungen mit grampositiven *Lactococcus-lactis*-Bakterien ergaben während Hitzeschock eine Erniedrigung des rRNA-Gehalts pro Zelle um Werte von 30% ⁷⁴.

Untersuchungen an Adipozyten unter dem Einfluss von 6 Hormonen bzw. an kultivierten Preadipozyten mit Hilfe von TaqManTM-RT-PCR zeigen eine annähernd 2fach erhöhte Expression von 18SrRNA. Von 11 untersuchten Housekeeping-Genen zeigte lediglich GAPDH eine stabile Expression ¹³⁴.

5.4 Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden und Schlussfolgerungen

Die Quantifizierung von mRNA ist problematisch. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass es keinen idealen und allgemein gültigen internen Standard gibt und man vorsichtig mit der Verallgemeinerung von Daten sein sollte. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass in den untersuchten Hypertrophie- und Herzinsuffizienzmodellen lediglich die linksventrikuläre 18SrRNA-Expression in allen untersuchten Gruppen stabil war. Die mRNA-Expression von GAPDH, Cyclophilin und PBGD unterschieden sich in den einzelnen Tiergruppen zum Teil erheblich.

Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sollten einige Punkte berücksichtigt werden. Eine Ursache für die zum Teil konträren Ergebnisse in anderen Studien könnten unterschiedliche Genregulationsmechanismen *in vivo* und *in vitro* sein. Häufig werden Untersuchungen zur Genregulation an einzelnen Zelltypen durchgeführt. Die Übertragung der Ergebnisse auf einen Organismus sind nur bedingt möglich. Da für die vorliegende Studie die linksventrikuläre Genexpression an verschiedenen Hypertrophie- und Herzinsuffizienzmodellen *in vivo* untersucht wurde, kann nicht auf die Expression in einzelnen Zelltypen zurückgeschlossen werden.

Beim Infarktmodell ist zu beachten, dass für die Untersuchungen lediglich vitales Gewebe des linken Ventrikels verwendet wurde. Im Gegensatz zum gesunden Myokard sind Myofibroblasten Hauptbestandteil des Infarktgewebes. Daher könnte sich die Genexpression zwischen Narbengewebe und gesundem Myokard unterscheiden. Die Ergebnisse beziehen sich jedoch nur auf das gesunde Myokard. Mögliche Unterschiede der Genexpression im schmalen ischämischen Bereich um die Infarktnarbe haben, aufgrund des geringen Anteils, kaum einen Einfluss auf die Genexpression im vitalen Rest des linken Ventrikels.

In allen untersuchten Tiermodellen kommt es zur kardialen Hypertrophie, das heißt zu einer Zunahme der Masse des einzelnen Myozyten. Die Hypertrophie geht einher mit einer generellen Vermehrung von RNA und Proteinen. Eine gleichbleibende Expression bedeutet in diesem Fall, dass die mRNA-Konzentration im Verhältnis zur Gesamt-RNA gleich bleibt. Es kommt jedoch zu einer absoluten Zunahme der Expression der Zelle. Interessanterweise zeigen die Infarkttiere eine deutlich verminderte Expression von GAPDH und PBGD. Die Expression von Cyclophilin ist von der Tendenz ebenfalls eher erniedrigt. Dagegen ist die 18SrRNA-Expression in den Infarkttieren gegenüber Kontrolltieren eher erhöht.

Da die ribosomale RNA den größten Anteil an der Gesamt-RNA ausmacht, könnten bereits geringe Schwankungen in der ribosomalen Expression zu einer verminderten mRNA-Konzentration der anderen Gene führen. Umgekehrt hat eine veränderte Expression bestimmter Gene kaum Einfluss auf die ribosomale RNA-Konzentration.

Die mRNA-Messung der einzelnen Housekeeping-Gene sowie von ANP erfolgte 30 Tage nach Durchführung der Intervention. Diese Studie untersuchte daher nicht den zeitlichen Verlauf, sondern das Genexpressionsmuster des linken Ventrikels zu einem definierten Zeitpunkt. Es ist bekannt, dass es z.B. beim Myokardinfarkt zu einem spezifischen zeitabhängigen Genexpressionsmuster kommt. Möglicherweise sind einige der untersuchten Gene ebenfalls zeitabhängig reguliert und haben zum Messzeitpunkt bereits wieder Normalwerte erreicht, andere Gene könnten erst sehr spät reguliert sein, so dass nachgewiesene Veränderungen in der Genexpression sich vielleicht zu einem früheren Zeitpunkt noch nicht nachweisen ließen.

Auffällig sind die in Abhängigkeit von der verwendeten Detektionsmethode sehr unterschiedlichen Ergebnisse der mRNA-Expression. Während das RPA keine Unterschiede in der Expression der einzelnen Housekeeping-Gene nachweisen konnte, zeigte die TaqManTM-PCR zum Teil deutliche Unterschiede in der Expression von GAPDH, Cyclophilin und PBGD in den untersuchten Hypertrophie- und Herzinsuffizienzmodellen. Lediglich 18SrRNA zeigte nur geringe Unterschiede der Genexpression in den einzelnen Gruppen. Die Expressionsergebnisse korrelieren jedoch zwischen RPA und TaqManTM-PCR. Insbesondere beim Vergleich der ANP-mRNA-Expression werden diese Unterschiede zwischen beiden Methoden deutlich. Beim RPA war die ANP-mRNA-Expression in den Tieren mit kleinem und großem Shunt jeweils um das 1,5fache und in den Infarkttieren um das 1,4fache erhöht. Mit der TaqManTM-PCR ließen sich deutlich höhere Expressionswerte für ANP nachweisen. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten Tiere mit kleinem Shunt 3,5fach erhöhte, Infarkttiere 6,7fach erhöhte und Tiere mit großem Shunt sogar 43fach erhöhte ANP-mRNA-Expressionswerte. Die TaqManTM-PCR ist eine sehr sensitive Methode, die bereits 10 mRNA Kopien in einer Probe und geringe Änderungen in der Genexpression nachweisen kann. Weiterhin zeichnet sie sich gegenüber dem RPA durch einen größeren dynamischen Messbereich aus. Beim RPA wird die Genexpression anhand der optischen Dichte bestimmt. Befindet man sich mit den Expressionswerten an der oberen messbaren Dichte können Unterschiede nicht mehr detektiert werden. Dies ist eine Erklärung für die geringen Unterschiede in der mit dem RPA gemessenen ANP Expression im kleinen und großen Shunt.

Aufgrund der eingeschränkten Auflösung lassen sich im Gegensatz zur TaqManTM-PCR geringe Veränderungen in der Genexpression nicht nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Studie und andere Veröffentlichungen über die Expression von Housekeeping-Genen zeigen, dass deren Regulation auf komplexen pathophysiologischen Mechanismen beruht. Hieraus wird die Notwendigkeit deutlich, nur für die spezifischen experimentellen Bedingungen geeignete Kontrollgene als interne Standards zu verwenden. Gleichzeitig sollten Veröffentlichungen, die die mRNA-Expression verschiedener Gene untersuchen, kritisch in Bezug auf das gewählte Standardgen analysiert werden. Der allgemeine Vorschlag, ribosomale RNA als internen Standard zu verwenden, ist nicht zu empfehlen, da es Untersuchungen gibt, die eine veränderte Expression nachgewiesen haben. Für die kardiale mRNA-Expression-Analyse in den hier untersuchten Hypertrophie- und Herzinsuffizienzmodellen stellt 18SrRNA, wie auch in vielen anderen Untersuchungen gezeigt, das zuverlässigste Kontrollgen dar.

6. Zusammenfassung

Housekeeping-Gene sind Gene, die nicht reguliert werden. Sie werden unabhängig von Umwelteinflüssen in allen Zellen konstant exprimiert. Häufig kodieren sie für Proteine, die der Aufrechterhaltung basaler Stoffwechselfunktionen dienen. Typische Housekeeping-Gene sind Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Porphobilinogen-Desaminase (PBGD), Cyclophilin und ribosomale RNA. Aufgrund ihrer stabilen Expression in allen Zellen werden Housekeeping-Gene häufig als interner Standard für die Normalisierung von mRNA bei Expressionsanalysen verwendet. Dies ist notwendig, um Messfehler bei der RNA-Quantifizierung zu vermeiden.

Unterschiedliche Veröffentlichungen zeigen jedoch die Regulation von Housekeeping-Genen unter verschiedenen Bedingungen wie Hypoxie und Zellproliferation. Es ist daher erforderlich, Housekeeping-Gene unter den spezifischen experimentellen Bedingungen auf ihre Eignung als interner Standard zu prüfen.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt lagen keine Kenntnisse über die Expression von Housekeeping-Genen bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz vor. Es ist bekannt, dass kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz durch charakteristische Änderungen in der Genexpression gekennzeichnet sind. Eine Regulation der Housekeeping-Gene kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen geeigneten internen Standard für die Quantifizierung von mRNA bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz zu finden. Hierzu wurde die linksventrikuläre mRNA-Expression der Housekeeping-Gene GAPDH, Cyclophilin, PBGD und 18SrRNA in verschiedenen experimentellen Tiermodellen der Ratte bestimmt. Als Hypertrophiemodell wurde der kleine aortokavale Shunt, als Herzinsuffizienzmodell der große aortokavale Shunt und der Myokardinfarkt verwendet. Die hämodynamischen Messungen wurden 30 Tage nach der Operation durchgeführt. Die erhobenen Daten belegen, dass kleiner Shunt, großer Shunt und Myokardinfarkt als experimentelle Tiermodelle für kardiale Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz geeignet sind.

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mit Hilfe des Ribonuklease-Protektion-Assay (RPA) und der TaqManTM-PCR. Beide Methoden werden zur Quantifizierung von mRNA verwendet, wobei sich die TaqManTM-PCR durch ihre höhere Sensitivität und Spezifität auszeichnet.

ANP-mRNA, ein Marker für kardiale Hypertrophie, diente als Positivkontrolle. Die linksventrikuläre Expression von ANP-mRNA war in allen untersuchten Tiermodellen gegenüber Kontrolltieren signifikant erhöht.

Die mit Hilfe des RPA gemessene linksventrikuläre mRNA-Expression aller untersuchten Housekeeping-Gene in Tieren mit kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz war im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert. Dagegen ergaben sich mit der sehr sensitiven TaqManTM-PCR signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression von GAPDH, Cyclophilin und PBGD. Die GAPDH-mRNA-Expression und die PBGD-mRNA-Expression im linken Ventrikel von Infarkttieren war im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich erniedrigt. Die linksventrikuläre Cyclophilin-mRNA-Expression bei Tieren mit großem Shunt war gegenüber Tieren mit kleinem Shunt und Kontrolltieren deutlich erhöht. Lediglich 18SrRNA zeigte in allen untersuchten Tiermodellen eine stabile Expression.

Die vorliegende Arbeit konnte mit Hilfe der sehr sensitiven TaqManTM-PCR nachweisen, dass die Housekeeping-Gene GAPDH, Cyclophilin und PBGD bei kardialer Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz reguliert werden. Aufgrund der stabilen Expression, unabhängig von der verwendeten Quantifizierungsmethode, ist 18SrRNA als interner Standard für die quantitative Analyse der mRNA-Expression in den untersuchten experimentellen Modellen für kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz am besten geeignet. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit der Verwendung eines geeigneten internen Standards bei der Quantifizierung von mRNA unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

7. Literaturverzeichnis

1. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J Mol Biol.* 1961;3:318-356.
2. Avery O, MacLeod C, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med.* 1944;79:137-158.
3. Liang P, Pardee A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the Polymerase Chain Reaction. *Science.* 1992;257:967-971.
4. Abbott A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature.* 1999;402:715-720.
5. Nover. Molekulare Grundlagen der Zelldifferenzierung. In: Zelldifferenzierung, molekulare Grundlagen und Probleme. Nover, Luckner, Parthier, Ed. 1973. Gustav Fischer Verlag, Jena.
6. Jacob F, Monod J. Genetic repression, allosteric inhibition and cellular differentiation. In: Cytodifferentiation and Macromolecular synthesis. Locke M, Ed. 1963. Academic press, New York.
7. Löffler G. Nucleotide und Nucleinsäuren. In: Biochemie und Pathobiochemie. Löffler, Petrides, Ed. 1997. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
8. Knippers R. RNA-Polymerasen und die Voraussetzungen für die Transkription von Eukaryotengen. In: Molekulare Genetik. Knippers R, Ed. 2001. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.
9. Dynan W, Tjian R. Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature.* 1985;316:774-778.
10. Maniatis T, Goodbourn S, Fischer J. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science.* 1987;236:1237-1245.
11. Smale S, Baltimore D. The "initiator" as a transcription control element. *Cell.* 1989;57:103-113.
12. Eick D, Wedel A, Heumann H. From initiation to elongation: comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. *Trends Genet.* 1994;10:292-296.
13. Dreyfuss G, Matunis M, Pinol-Roma S, Burd C. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:289-321.
14. Lamond A. Nuclear RNA processing. *Curr Opin Cell Biol.* 1991;3:493-501.

15. Löffler G. Transkription und posttranskriptionale Prozessierung der RNA. In: Biochemie und Pathobiochemie. Löffler, Petrides, Ed. 1997. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
16. Löffler G. Proteinbiosynthese, Proteinmodifizierung und Proteinabbau. In: Biochemie und Pathobiochemie. Löffler, Petrides, Ed. 1997. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
17. Felsenfeld G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature*. 1992;355:219-224.
18. Croston G, Kadonaga J. Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5:417-423.
19. Varani G. A cap for all occasions. *Structure*. 1997;5:855-858.
20. Proudfoot N. Ending the message is not so simple. *Cell*. 1996;87:779-781.
21. Krug R. The regulation of export of mRNA from nucleus to cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5:944-949.
22. Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*. 1991;266:19867-19870.
23. Proud C. Guanine nucleotides, protein phosphorylation and the control of translation. *Trends Biochem Sci*. 1986;11:73-77.
24. Darnell J. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature*. 1982;297:365-371.
25. Krajewska W. Regulation of transcription in eukaryotes by DNA-binding proteins. *Int J Biochem*. 1992;24:1885-1898.
26. Muller M, Gerster T, Schaffner W. Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *Eur J Biochem*. 1988;176:485-495.
27. Wenzel, Amann. Lexikon der Gentechnologie. 1991.
28. Pabo C, Sauer R. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:1053-1095.
29. Cowell I. Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends Biochem Sci*. 1994;19:38-42.
30. Levine M, Manley J. Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell*. 1989;59:405-408.
31. Grimm S, Baeuerle P. The inducible transcription factor NF- κ B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J*. 1993;290:297-308.
32. Razin A, Cedar H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev*. 1991;55:451-458.

33. Eden S, Cedar H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev*. 1994;4:255-259.
34. Huck-Hui Ng, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9:158-163.
35. Doerfler W. DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:93-124.
36. Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell*. 1988;53:3-4.
37. Dynan W. Understanding the molecular mechanism by which methylation influences gene expression. *Trends Genet*. 1989;5:35-36.
38. Holler M, Westin G, Jiricny J, Schaffner W. Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev*. 1988;2:1127-1135.
39. Jones P. The DNA methylation paradox. *TIG*. 1999;15:34-37.
40. Mitchell P, Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*. 1989;245:371-378.
41. Knippers R. Regulation genetischer Aktivität. In: Molekulare Genetik. Knippers R, Ed. 2001. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.
42. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987;196:261-282.
43. Antequera F, Bird A. CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr Biol*. 1999;9:R661-R667.
44. Stryer L. Eukaryotic Chromosomes and Gene Expression. In: Biochemistry. Stryer L, Ed. 1995. W. H. Freeman and Company, New York.
45. Lercher M, Urrutia A, Hurst L. Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. *Nature genetics, Advance online publication*. 2002;DOI:10.1038/ng887:35-36.
46. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*. 1999;75:291-295.
47. Zhong H, Simons J. Direct comparison of GAPDH, actin, cyclophilin and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res*. 1999;259:523-526.
48. Andreeva L, Motterlini R, Green C. Cyclophilins are induced by hypoxia and heat stress in myogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237:6-9.

49. Gong Y, Cui L, Minuk Y. Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1996;23:734-737.
50. Escoubet B, Planès C, Clerici C. Hypoxia increases glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase transcription in rat alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun. and Biophysical Research Communications*. 1999;266:156-161.
51. Goldsworthy S, Goldsworthy T, Sprankle C, Butterworth B. Variation in expression of genes used for normalization of Northern blots after induction of cell proliferation. *Cell Prolif*. 1993;26:511-518.
52. de Leeuw W, Slagbloom P, Vijg J. Quantitative comparison of messenger RNA levels in mammalian tissues-28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. *Nucleic Acids Research*. 1989;17:10137-10138.
53. Weisinger G, Gavish M, Mazurika C, Zinder O. Transcription of actin, cyclophilin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes: tissue- and treatment-specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999;1446:225-232.
54. Sirover M. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999;1432:159-184.
55. Sirover M. Role of the glycolytic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in normal cell function and in cell pathology. *J Cell Biochem*. 1997;66:133-140.
56. Berry M, Boulton A. Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase and apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*. 2000;60:150-154.
57. Zhang J, Snyder S. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:9382-9385.
58. Tokunaga K, Nakamura Y, Sakata K, Fujimori K, Ohkubo M, Sawada K, Sakiyama S. Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in human lung cancers. *Cancer Res*. 1987;47:5616-5619.
59. Bereta J, Bereta M. Stimulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels by endogenous nitric oxide in cytokine-activated endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;217:363-369.
60. Yamada H, Chen D, Monstein H, Håkanson R. Effects of fasting on the expression of gastrin, cholecystikinin, and somatostatin genes and of various housekeeping genes in the pancreas and upper digestive tract of rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231:835-838.
61. Danielson P, Forss-Petter S, Brow M, Calavetta L, Douglass J, Milner R, Sutcliffe J. p1B15: A cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA*. 1988;7:261-267.

62. Savonet V, Maenhaut F, Miot F, Pirson I. Pitfalls in the use of several "housekeeping" genes as standards for quantitation of mRNA: The example of thyroid cells. *Anal Biochem.* 1997;247:165-167.
63. Handschumacher R, Harding M, Rice J, Drugge R, Speicher D. Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science.* 1984;226:544-547.
64. Feroze-Merzoug F, Berquin I, Dey J, Chen Y. Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) as a preferred internal control over GAPDH and beta-actin in quantitative RNA analyses. *BioTechniques.* 2002;32:776-782.
65. Andreeva L, Heads R, Green C. Cyclophilins and their possible role in the stress response. *Int J Exp Pathol.* 1999;80:305-315.
66. Cardalda C, Batlle A, Juknat A. Sequence and structure of the rat housekeeping PBG-D isoform. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249:438-443.
67. Fink L, Stahl U, Ermert L, Kummer W, Seeger W, Bohle R. Rat Porphobilinogen deaminase gene: A pseudogene-free internal standard for laser-assisted cell picking. *BioTechniques.* 1999;26:510-516.
68. Sun D, Seki G, Uwatoko S, Nakao A, Goto A, Fujita T, Kimura S, Taniguchi S. Quantifying porphobilinogen deaminase mRNA in microdissected nephron segments by a modified RT-PCR. *Kidney Int.* 2002;61:336-341.
69. Kwon H, Green M. The RNA polymerase I transcription factor, upstream binding factor interacts directly with the TATA box-binding protein. *J Biol Chem.* 1994;269:30140-30146.
70. Oliveira J, Prados R, Guedes A, Ferreira P, Kroon E. The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is inappropriate as internal control in comparative studies between skin tissue and cultured skin fibroblasts using Northern blot analysis. *Arch Dermatol Res.* 1999;291:659-661.
71. Hyman G, Fingerhut B, Tiburcio A. Possible defect in RNA metabolism in leukemic cells. *Cancer.* 1968;21:357-367.
72. Torelli U, Torelli G, Andreoli A, Mauri C. Partial failure of methylation and cleavage of 45S RNA in the blast cells of acute leukaemia. *Nature.* 1970;226:1163-1165.
73. Raaijmakers M, van Emst L, de Witte T, Mensink E, Raymakers A. Quantitative assessment of gene expression in highly purified hematopoietic cells using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Exp Hematol.* 2002;30:481-487.
74. Hansen M, Nielsen A, Molin S, Hammer K, Kilstrup M. Changes in rRNA levels during stress invalidates results from mRNA blotting: Fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. *J Bacteriol.* 2001;183:4747-4751.
75. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 1994. Walter de Gruyter, Berlin-New York.

76. Kurowski V. Herzinsuffizienz. In: Basislehrbuch Innere Medizin. Renz-Polster D, Braun J, Ed. 2001. Urban & Fischer Verlag, München-Jena.
77. Ho K, Pinski J, Kannel W, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:6A-13A.
78. Katz AM. The heart in congestive failure. *Cardioscience*. 1990;1:3-6.
79. Braunwald E. Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. 1996. W.B.Saunders Company, Philadelphia.
80. Smith S, Fuchs F. Effect of ionic strength on length-dependent Ca^{2+} activation in skinned cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:2115-2125.
81. Fuchs F, Wang Y. Sarcomere length versus interfilament spacing as determinants of cardiac myofilament Ca^{2+} sensitivity and Ca^{2+} binding. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:1375-1383.
82. Fuchs F, Wang Y. Force length, and Ca^{2+} -troponin C affinity in skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1991;261:C787-C792.
83. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension*. 2000;35:19-24.
84. Razeghi P, Young M, Alcorn J, Moravec C, Frazier O, Taegtmeyer H. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation*. 2001;104:2923-2936.
85. Samuel J, Dubus I, Contard F, Schwartz K, Rappaport L. Biological signals of cardiac hypertrophy. *Eur Heart J*. 1990;11:1-7.
86. Serneri G, Modesti P, Boddi M, Cecioni I, Paniccia R, Coppo M, Galanti G, Simonetti I, Vanni S, Papa L, Bandinelli A, Migliorini A, Modesti A, Maccerini M, Sani G, Toscano M. Cardiac growth factors in human hypertrophy. *Circ Res*. 1999;85:57-67.
87. Hefti M, Harder B, Eppenberger H, Schaub M. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2873-2892.
88. Nakao K, Itoh H, Suga S, Ogawa H, Imura H. The natriuretic peptide family. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993;2:45-50.
89. Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem*. 1992;267:13928-13932.
90. Langenickel T, Pagel I, Höhnelt K, Dietz R, Willenbrock R. Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H1500-H1506.

91. Cowie M, Struthers A, Wood D, Coats A, Thompson S, Poole-Wilson P. Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet*. 1997;350:1347-1351.
92. de Bold A, Borenstein H, Veress A, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sciences*. 1981;28:89-94.
93. Maki M, Takayanagi R, Misono K, Pandey K, Tibbetts C, Inagami T. Structure of rat atrial natriuretic factor precursor deduced from cDNA sequence. *Nature*. 1984;309:722-724.
94. Seidman C, Duby A, Choi E, Graham R, Haber E, Homcy C, Smith J, Seidman J. The structure of preproatrial natriuretic factor as defined by a complementary DNA clone. *Science*. 1984;225:324-326.
95. Yamanaka M, Greenberg B, Johnson L, Seilhamer J, Brewer M, Friedemann T, Miller J, Atlas S, Laragh J, Lewicki J, Fiddes J. Cloning and sequence analysis of the cDNA for the rat atrial natriuretic factor precursor. *Nature*. 1984;309:719-722.
96. Zivin R, Condra J, Dixon R, Seidah N, Chretien M, Nemer M, Chamberland M, Drouin J. Molecular cloning and characterization of DNA sequences encoding rat and human atrial natriuretic factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:6325-6329.
97. Oikawa S, Imai M, Ueno A, Tanaka S, Noguchi T, Nakazato H, Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide. *Nature*. 1984;309:724-726.
98. Koller K, Goeddel D. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation*. 1992;86:1081-1087.
99. Baxter J, Lewicki J, Gardner D. Atrial natriuretic peptide. *Bio-Technology*. 1988;6:529-546.
100. de Bold A. Atrial natriuretic factor: A hormone produced by the heart. *Science*. 1985;230:767-770.
101. Bloch K, Scott J, Zisfein J, Fallon J, Margolies M, Seidman C, Matsueda G, Homcy C, Graham R, Seidman J. Biosynthesis and secretion of proatrial natriuretic factor by cultured rat cardiocytes. *Science*. 1985;230:1168-1171.
102. Abe T, Nishiyama K, Snajdar R, He X, Misono K. Aortic smooth muscle contains guanylate-cyclase-coupled 130-kDa atrial natriuretic factor receptor as predominant receptor form. Spontaneous switching to 60-kDa C-receptor upon cell culturing. *Eur J Biochem*. 1993;217:295-304.
103. Davidson N, Struthers A. Brain natriuretic peptide. *J Hypertens*. 1994;12:329-336.

104. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumara K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*. 1994;90:195-203.
105. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serin protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *PNAS*. 2000;97:8525-8529.
106. de Bold A, Kuroski-de Bold M, Boer P, Dube G, Mangat H, Johnson F. A decade of atrial natriuretic factor research. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991;69:1480-1485.
107. Skvorak J, Nazian S, Dietz J. Endothelin acts as a paracrine regulator of stretch-induced atrial natriuretic peptide release. *Am J Physiol*. 1995;269:R1093-R1098.
108. Leskinen H, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Combined inhibition of endothelin and angiotensin II receptors blocks volume load-induced cardiac hormone release. *Circ Res*. 1997;80:114-123.
109. Skvorak J, Dietz J. Endothelin and nitric oxide interact to regulate stretch-induced ANP secretion. *Am J Physiol*. 1997;273:R301-R306.
110. Mercadier J, Zongazo M, Wisnewsky C, Butler-Brown G, Gros D, Carayon A, Schwartz K. Atrial natriuretic factor messenger ribonucleic acid and peptide in the heart during ontogenetic development. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;159:777-782.
111. Michel J, Arnal J, Corvol P. Atrial natriuretic factor as a marker in congestive heart failure. *Horm Res*. 1990;34:166-168.
112. Garcia R, Diebold S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovascul Res*. 1990;24:430-432.
113. Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Kloner R, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979;44:503-512.
114. Schild T. Einführung in die Real-Time TaqManTM-PCR-Technologie. 1997. PE Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt.
115. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Extraction and Purification of RNA. In: Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 1989.
116. Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159.
117. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde. In: Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 1989.
118. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:5463-5467.

119. Leutenegger C, Higgins J, Matthews T, Rarantal A, Lucie P, Pedersen N, North T. Real-Time TaqMan PCR as a specific and more sensitive alternative to the branched-chain DNA assay for quantitation of simian immunodeficiency virus RNA. *Hum Retroviruses*. 2001;17:243-251.
120. Loeb K, Jerome K, Goddard J, Huang M, Cent A, Corey L. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology*. 2000;32:626-629.
121. Willenbrock R, Haass M, Osterziel K, Fischer T, Dietz R. Induktion der atrialen und ventrikulären ANF-Synthese bei experimenteller Herzinsuffizienz nach aortokavalem Shunt. *Z Kardiol*. 1993;82:648-653.
122. Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okumara K, Obata K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, Yamada T, et al. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J Clin Invest*. 1989;83:298-305.
123. Takahashi T, Allen P, Izumo S. Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptides genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene. *Circ Res*. 1992;71:9-17.
124. Takeishi Y, Walsh R. Cardiac hypertrophy and failure: lessons learned from genetically engineered mice. *Acta Physiol Scand*. 2001;173:103-111.
125. Lee R, Gay R, Moffett C, Johnson D, Goldman S. Atrial natriuretic peptide levels during development of chronic heart failure after myocardial infarction in rats. *Life Sci*. 1987;40:2025-2030.
126. Lattion A, Michel J, Arnould E, Corvol P, Soubrier F. Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat. *Am J Physiol*. 1986;251:H890-H896.
127. Arbustini E, Pucci A, Grasso M, Diegoli M, Pozzi R, Gavazzi A, Graziano G, Campana C, Goggi C, Martinelli L, et al. Expression of natriuretic peptide in ventricular myocardium of failing human hearts and its correlation with the severity of clinical and hemodynamic impairment. *Am J Cardiol*. 1990;66:973-980.
128. Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, Yamada T, Itoh H, Makoyama M, et al. Relationship between ventricular expression of atrial natriuretic polypeptide gene hemodynamic parameter in old myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;13:S1-S4.
129. Takemura G, Fujiwara H, Horike K, Mukoyama M, Saito Y, Nakao K, Matsuda M, Kawamura A, Ishida M, Kida M, et al. Ventricular expression of atrial natriuretic polypeptide and its relations with hemodynamics and histology in dilated human hearts. Immunohistochemical study of the endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 1989;80:1137-1147.
130. Révillion F, Pawlowski V, Hornez L, Peyrat J-P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 2000;36:1038-1042.

131. Schek N, Hall B, Finn O. Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1988;48:6354-6359.
132. Vila M, Nicolas A, Morote J, Meseguer A. Increases glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in renal cell carcinoma identified by RNA-based arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Cancer.* 2000;89:152-164.
133. Calvo E, Boucher C, Coulombe Z, Morisset J. Pancreatic GAPDH gene expression during ontogeny and acute pancreatitis induced by caerulein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235:636-640.
134. Gorzelnik K, Janke J, Engeli S, Sharma A. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res.* 2001;33:625-627.
135. Steele B, Meyers C, Ozbun M. Variable expression of some "housekeeping" genes during human keratinocyte differentiation. *Anal Biochem.* 2002;307:341-347.
136. Cipkala D, Livingston W, Cody R. Influence of pressure overload and ACE inhibitor therapy on constitutive protein mRNA expression in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 1996;9:393-396.
137. Tomaro M, Frydman R, Gutnisky A, Sburlati A. Induction of porphobilinogen oxygenase and porphobilinogen deaminase in rat blood under conditions of erythropoietic stress. *Biochim Biophys Acta.* 1981;676:31-42.
138. Chenais B, Molle I, Trentesaux C, Jeannesson P. Time-course of butyric acid-induced differentiation in human K562 leukemic cell line: Rapid increase in gamma-globulin, porphobilinogen deaminase and NF-E2 mRNA levels. *Leukemia.* 2002;1997:9-1575.
139. Greenbaum L, Gozlan Y, Schwartz D, Katcoff D, Malik Z. Nuclear distribution of porphobilinogen deaminase (PBGD) in glioma cells: a regulatory role in cancer transformation ? *Br J Cancer.* 2002;86:1006-1011.
140. Perfetti V, Manenti G, Gragani TA. Expression of housekeeping genes in Hodgkin's disease lymph nodes. *Leukemia.* 1991;5:1110-1112.
141. Finnegan M, Goepel J, Hancock B, Goyns M. Investigation of the expression of housekeeping genes in Non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 1993;10:387-393.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. R. Willenbrock und insbesondere bei meinem Betreuer Dr. Th. Langenickel für die wissenschaftliche und methodische Betreuung und den anhaltenden Zuspruch und Motivation bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. I. Pagel für die Bereitstellung der Shunttiere und Frau Astrid Schiche (MTA) für die Bereitstellung der Infarkttiere sowie der Durchführung der hämodynamischen Messungen. Bei Frau Jeannette Mothes (MTA) möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Einarbeitung ins Labor bedanken. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Mattjasch, Anna und Babette für's Mut machen und für's immer Dasein bedanken.

Meinen ganz großen Dank gilt meinen Eltern Gabriele und Michael Rettschlag, die immer für mich da sind. Ohne ihre Unterstützung hätte ich das Medizinstudium nicht durchführen und die vorliegende Arbeit fertig stellen können.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jeannine Rettschlag
Geboren am	08. Juli 1975
Geburtsort	Berlin
Familienstand	ledig
Kinder	keine
Nationalität	deutsch

Ausbildung

1982 bis 1990	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Berlin
1990 bis 1993	Spezialoberschule für Naturwissenschaften und Mathematik „Heinrich-Hertz- Oberschule“ in Berlin
1993-1995	Max-Planck-Oberschule in Berlin
1995	Abitur
1995 bis 1996	Au Pair in Amerika
10/1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
08/1998	Physikum
08/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01/2001- 08/2001	Erasmus-Aufenthalt an der Universität von Linköping (Schweden)
04/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2002-03/2003	Praktisches Jahr
06/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 07/2003	Ärztin im Praktikum in der Kinderklinik des Carl-Thiem-Klinikum in Cottbus

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln sowie der in der Danksagung erwähnten Unterstützung durchgeführt habe. Die Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Veröffentlichungen dar. Die verwendete Literatur wurde vollständig angegeben.

Berlin, den 12.12.2003